



Microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés

Jessica Bile

► To cite this version:

Jessica Bile. Microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés. Chimie théorique et/ou physique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10182 . tel-01267568

HAL Id: tel-01267568

<https://theses.hal.science/tel-01267568>

Submitted on 4 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1

Ecole Doctorale de Chimie

PROJET A COLLABORATION INDUSTRIELLE STABIPACK

Cette thèse de doctorat intitulée

« Microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés »

a été présentée et soutenue publiquement par **BILE Jessica** le 21 octobre 2015

Devant le jury d'examen composé des personnes suivantes :

Pr Hatem FESSI

Pr Marie-Alexandrine BOLZINGER

Dr SKIBA Mohamed

Pr Denis WOUESSIDJEWE

Président du jury

Co-directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Pour l'obtention du grade de :

Docteur en physico-chimie et pharmacotechnie



N° d'ordre :

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale de Chimie

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 07 août 2006)

Soutenue publiquement le 21 octobre 2015

par

BILE Jessica

Directeur de thèse : Chevalier Yves

Jury :

Pr Hatem FESSI

Pr Marie-Alexandrine BOLZINGER

Dr SKIBA Mohamed

Pr Denis WOUESSIDJEWE

Président du jury

Co-directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du **projet Stabipack** décidé par la Cosmetic Valley et Plastipolis. Le projet Stabipack regroupe un consortium d'entreprises et de laboratoires à savoir,

- trois laboratoires :



- et cinq entreprises :



Remerciements

Cette thèse s'est déroulée au sein du LAGEP sous la direction du directeur du laboratoire Mr FESSI Hatem ainsi que Mme BOLZINGER Marie-Alexandrine et Mr CHEVALIER Yves.

Je tiens à remercier vivement Mr. SKIBA Mohamed ainsi que Mr. Denis WOUESSIDJEWÉ d'avoir accepté ce travail de rapporteur.

Au moment de clôturer la rédaction de ce manuscrit, trois ans riches de rencontres se sont écoulés. A ce titre je n'oublie pas les doctorants, et surtout amis du LAGEP: Laure (ma collaboratrice de DNUD), Barthélémy (la force tranquille), Fabrice (le week-end worker), Delphine (« Madame ACH »), et bien sûr la dernière mais pas des moindres : Angèle (Lara Croft). Les midis détentes partagés ensemble et les petits moments dans le bureau empreints de bonne humeur laisseront des souvenirs impérissables ! Je pense notamment à la vidéo en slow motion homemade du bateau qui n'aura pas la même saveur sans Laure.

J'adresse également mes remerciements à Jean-Pierre et Sébastien, les géo trouve-tout, qui m'ont plusieurs fois sorti d'une situation technique difficile et toujours avec le sourire. Je n'oublie pas non plus Nadia qui m'a toujours accueillie avec gentillesse malgré les difficultés de la paperasserie ! Je tiens également à remercier Jocelyne PELLETIER et Olivier BOYRON pour leur aide concernant les appareils analytiques, leur gentillesse et leur disponibilité.

Je pense aussi à tous mes stagiaires qui ont participé à ce projet en apportant chacun (et surtout chacune !) leur pierre à l'édifice : Charlène, Flora, Laura, Lucile, Kathrin, Astrid, Thanya,... Je vous souhaite le meilleur pour la suite et je suis certaine que votre stage saura vous ouvrir des portes.

Je remercie Mike PARIENTE et Virginie VERMARE pour leur gentillesse et leurs conseils avisés. Ils font partie des professeurs comme il y en a peu qui savent vous transmettre leur passion et qui vous donne l'envie de continuer. D'ailleurs il paraît que la banque me regrette déjà !

J'adresse également mes remerciements à Mr BALLETT Thomas (alias TBA), l'homme qui a su se faire une place à côté de Mr Carpenter. Un chef d'orchestre pas comme les autres qui connaît la juste valeur de Céline et de la hyène-otarie. JBI te remercie pour la formation que tu lui as prodiguée, bien que trop courte, tu sais à quel point elle fut bénéfique et appréciée. Merci pour ta générosité.

Enfin last but not least je remercie ma famille. Merci pour votre présence indéfectible dans les bons mais aussi les mauvais moments. Merci pour m'avoir supportée et encouragée quelles que soient les circonstances. Si j'en suis ici aujourd'hui vous en êtes une des causes indéniables. Mes pensées vont également vers celui avec qui je partage ma vie, sans doute l'homme le plus gentil et patient du monde. Je n'oublie pas non plus Marina, l'ange qui a croisé notre chemin et qui enlève nombre de ses embûches. A chacun son domaine de compétences et ce sera sans rancune : je sais que la lecture de ce mémoire fera de vous les Champollions des temps modernes si vous vous y risquez. Un commercial aurait pu vous le vendre comme ceci : *la chose à ne pas négliger dans ce mémoire est qu'il fera un excellent livre de chevet pour trouver le sommeil !* ***Je vous dédie ce manuscrit*** car vous ne saisissez peut-être pas le fond mais ce n'est pas là l'essentiel car vous comprendrez bien plus. Vous connaissez sa valeur symbolique à la hauteur des efforts qu'il a nécessités mieux que personne.

Table des matières

Introduction générale	1
Contexte	2
Le projet Stabipack	4
Les axes de recherche du projet de thèse	6
Structure du manuscrit	6
Références	9
 Etude bibliographique	 12
<i>Etude bibliographique - Chapitre I: La microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple : influence du procédé et des paramètres de formulation</i>	14
Introduction	16
1. L'encapsulation	16
1.1 Définition et historique	16
1.2 Objectifs de l'encapsulation et domaines d'application	17
2. Les microparticules : caractérisation	19
2.1 Taille	19
2.2 Structure interne	19
2.3 Quantification de l'actif encapsulé	20
3. Procédés de microencapsulation	21
3.1 Procédés mécaniques	21
3.2 Procédés chimiques	23
3.3 Procédés physico-chimiques	24
4. La microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple	30
4.1 Impact des paramètres de formulation sur les caractéristiques des microparticules	31
4.1.1 Le solvant	31
4.1.2 Le principe actif	33
4.1.3 La nature du polymère	34

4.1.4	Le couple actif/polymère.....	35
4.1.5	La masse et la masse molaire du polymère.....	35
4.1.6	Le rapport actif/polymère.....	37
4.1.7	L'agent stabilisant.....	38
4.1.8	Rapport de la fraction de phase organique/aqueuse.....	40
4.2	Impact des paramètres du procédé sur les caractéristiques des microparticules.....	42
4.2.1	Influence de la vitesse d'agitation et du cisaillement.....	42
4.2.2	Impact des conditions d'évaporation.....	44
4.3	Etude de la cinétique d'évaporation.....	46
4.4	Etude de la cinétique de libération pour des microsphères polymériques.....	48
4.4.1	Les différents types de libération.....	48
4.4.2	Profils de libération pour des microsphères polymériques non dégradables.....	49
4.4.3	Influence de la taille des microparticules.....	50
4.4.4	Influence de la nature de la matrice enrobante.....	50
4.4.5	Influence des propriétés du principe actif.....	52
4.4.6	Influence de l'affinité actif/polymère.....	52
4.4.7	Influence de la teneur en principe actif.....	52
4.4.8	Influence de la localisation du principe actif.....	53
4.4.9	Influence de l'état de surface de la particule.....	54
	Conclusion.....	54
	Références.....	55

Etude bibliographique - Chapitre II: La conservation des formulations.....

	Introduction.....	71
1.	Les contaminations.....	71
1.1	Origines.....	71
1.2	Les règles de Bonnes Pratiques de Fabrication.....	72
2.	Les micro-organismes.....	72
2.1	Les bactéries.....	72

2.2	Les champignons microscopiques.....	73
2.2.1	Les levures.....	73
2.2.2	Les moisissures.....	74
2.3	La croissance microbienne.....	74
3	Les challenge tests.....	75
4	La protection contre les micro-organismes.....	76
4.1	La stérilisation.....	76
4.2	Les agents antimicrobiens.....	77
4.2.1	Définition et objectif.....	77
4.2.2	Mécanisme d'action.....	77
4.2.3	Le contexte concernant les conservateurs.....	78
5	Les alternatives à l'utilisation d'agents antimicrobiens.....	79
5.1	Paramètres du conditionnement.....	79
5.1.1	Le flacon pompe.....	79
5.1.2	Les doses unitaires.....	79
5.1.3	Conditionnements airless.....	80
5.1.4	Conditionnements antimicrobiens.....	80
5.2	Paramètres de la formule.....	80
5.2.1	Activité de l'eau.....	80
5.2.2	pH.....	83
5.2.3	Les tensioactifs.....	85
5.2.4	Combinaisons de technologies.....	86
6	Les facteurs influençant l'efficacité des agents antimicrobiens dans les formulations.....	87
6.1	L'inactivation des agents antimicrobiens par les composés de la formule.....	87
6.1.1	Coefficient de partage huile/eau.....	87
6.1.2	Les tensioactifs.....	88
6.1.3	Les autres excipients.....	90
6.2	L'inactivation des agents antimicrobiens par les composés du conditionnement.....	91
6.3	Effets synergiques.....	91

Conclusion.....	93
Références.....	94

Etude bibliographique - Chapitre III: Les conditionnements actifs antimicrobiens.....

Introduction.....	105
1. Les conditionnements actifs.....	106
1.1 Définition.....	106
1.2 Historique.....	106
2. Les conditionnements actifs antimicrobiens.....	107
2.1 Preuve de concept.....	107
2.2 Objectifs.....	108
2.3 Mécanismes d'action.....	110
3. Les différentes catégories de conditionnements actifs antimicrobiens.....	110
3.1 Utilisation de sachets contenant l'agent antimicrobien.....	111
3.2 Incorporation directe d'agents antimicrobiens au sein du matériel de conditionnement.....	115
3.3 Fonctionnalisation de la surface du conditionnement: enduction de films ou adsorption d'agents antimicrobiens.....	115
3.3.1 Enduction de films.....	115
3.3.2 Adsorption d'agents antimicrobiens.....	117
3.4 Immobilisation d'agents antimicrobiens.....	118
3.4.1 Immobilisation ionique.....	118
3.4.2 Immobilisation covalente.....	119
3.4.3 Activité antimicrobienne résultant de l'immobilisation.....	119
3.5 Utilisation d'un polymère intrinsèquement antimicrobien.....	119
3.6 Encapsulation.....	120
4. Comparaison des différentes méthodes de fonctionnalisation.....	121
5. Paramètres à prendre en compte lors de la réalisation d'un conditionnement actif antimicrobien.....	122
5.1 Modification des propriétés physico-chimiques des films polymériques.....	122

5.2 Facteurs influençant l'efficacité d'un conditionnement actif antimicrobien utilisant un mécanisme de diffusion.....	123
5.2.1 Compatibilité et interactions agent antimicrobien – film polymérique.....	123
5.2.2 Interaction agent antimicrobien – constituants de la formulation.....	125
5.2.3 Effet de l'épaisseur de couche déposée.....	127
5.2.4 Effet de la température.....	127
6. Tests permettant de démontrer l'efficacité des conditionnements actifs antimicrobiens.....	127
6.1 Méthode des milieux gélosés sur plaque.....	128
6.2 Méthode par agitation en flacon.....	128
Conclusion.....	129
Références.....	130

Etude expérimentale.....145

Introduction à l'étude expérimentale.....147

Partie expérimentale - Chapitre I: Détermination des paramètres influençant la morphologie des microsphères de poly(ϵ -caprolactone) et étude des cinétiques de libération résultantes.....158

Introduction.....160

Article 1.....164

Abstract.....164

1. Introduction.....165

2. Materials and Methods.....166

2.1. Materials.....166

2.2. Preparation of microspheres.....166

2.3. Particle size analysis.....167

2.4. In situ monitoring the emulsions with the video probe.....167

2.5. Scanning electron microscopy.....168

2.6. Evaporation rate of dichloromethane.....168

2.7. Viscosity measurements of the oil phase.....168

2.8. Measurement of interfacial tension by the pendant drop method.....	169
2.9. Surfactant partition coefficient.....	169
2.10. Determination of drug loading.....	169
2.11 Drug release experiments.....	169
3. Results.....	170
3.1. Microsphere morphologies.....	170
3.2. Assessment of the main mechanisms causing non-spherical particle shapes.....	174
3.3. Study of the evaporation rate of DCM.....	177
3.4. Characterization of the emulsion parameters.....	178
3.5. Effect of the stirring process.....	181
3.6. Effect of the polymer molar mass and concentration in the oil phase.....	181
3.7. Effect of the type of surfactant.....	182
3.8. In vitro drug release behavior of PCL microparticles.....	184
4. General discussion.....	186
4.1. Influence of the solvent evaporation rate.....	187
4.2. Influences of polymer concentration and molar mass and impact of the agitation system on morphologies.....	187
4.3. Effect of the interfacial stabilization.....	189
4.4. Impact of the surface state on the drug release rate.....	190
5. Conclusion.....	192
<i>Résumé des résultats principaux.....</i>	<i>198</i>

<i>Partie expérimentale - Chapitre II: Réalisation de films antimicrobiens contenant des microparticules pour l'obtention d'une forme à libération prolongée.....</i>	<i>201</i>
---	------------

<i>Introduction.....</i>	<i>203</i>
<i>Article 2.....</i>	<i>206</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>206</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>206</i>
<i>Materials.....</i>	<i>208</i>
<i>Methods.....</i>	<i>208</i>
<i>Preparation of microspheres.....</i>	<i>208</i>

Particle size analysis.....	208
Determination of phenylethyl alcohol content.....	208
Deposition of films by dip coating.....	209
Characterization of coatings.....	209
Surface morphology.....	210
Phenylethyl alcohol release experiments.....	210
Results and discussion.....	210
Microparticles realization and characterization.....	210
Effect of coating parameters on the film properties.....	211
Microstructure.....	213
Release studies.....	213
Conclusion.....	216
<i>Résumé des résultats principaux.....</i>	<i>222</i>

Partie expérimentale - Chapitre III: Etude du partage de l'alcool phényléthylique au sein d'une émulsion et mesure de l'activité antimicrobienne résultante.....

<i>Introduction.....</i>	<i>226</i>
Article 3.....	228
Abstract.....	228
1. Introduction.....	228
2. Materials and methods.....	230
2.1 Materials.....	230
2.2 Partition coefficient measurements.....	230
2.2.1 Oil/water partition coefficient.....	230
2.2.2 Micelle/water partition coefficient.....	231
2.3 Formulations preparation.....	231
2.4 Emulsion dosage	232
2.5 Microbiological assays.....	232
3. Results and discussion.....	233

3.1 Theoretical study.....	233
3.2 Partition coefficients.....	234
3.2.1 Study of the phenylethyl alcohol micelles solubilization.....	234
3.2.2 Investigation of the oil/water preservative partition.....	236
3.3 Emulsion dosage.....	236
3.4 Microbiological results.....	237
Conclusion.....	238
References.....	239
<i>Résumé des résultats principaux.....</i>	<i>241</i>
Discussion générale, perspectives et conclusion.....	243

Liste des figures et tableaux

Introduction générale

Figure 1. Evolution de la nature du conservateur et de la concentration utilisée dans les produits cosmétiques analysés par la société COSMEPAR entre 2010 et 2013.

Figure 2. Evolution de la non-conformité des challenge tests pour les produits cosmétiques testés par la société COSMEPAR entre 2010 et 2013 (non conforme ou critère B).

Figure 3. Représentation des différents domaines d'activité relatifs à la thèse.

Etude bibliographique

Chapitre I

Figure BI.1. Évolution du nombre d'articles scientifiques et de brevets publiés par année dans le domaine de la microencapsulation.

Figure BI.2. Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage représentant : A. microsphère dans laquelle le principe actif est dissout dans le matériau enrobant; B. microsphère dans laquelle le principe actif est dispersé dans le matériau enrobant; C. microcapsule.

Figure BI.3. Schématisation des différentes étapes d'un procédé de microencapsulation par évaporation de solvant.

Figure BI.4. Exemples de morphologies de microparticules: A. lisses; B. avec des cicatrices et des défauts; C. avec des cicatrices; D. rugueuses, E. trouées; F. trouées; G. poreuses; H. zoom sur une surface poreuse.

Tableau BI.1. Exemples de principes actifs hydrophiles et hydrophobes encapsulés par la méthode de microencapsulation par évaporation de solvant.

Tableau BI.2. Caractéristiques des différentes méthodes d'encapsulation.

Tableau BI.3. Caractéristiques des principaux solvants utilisés dans la littérature pour le procédé de microencapsulation par évaporation de solvant.

Tableau BI.4. Influence des paramètres de formulation sur les propriétés des microsphères.

Tableau B.I.5. Influence des paramètres du procédé sur les propriétés des microsphères.

Chapitre II

Figure BII.1. Structure de la surface d'une cellule bactérienne : a. Gram positif ; b. Gram négatif.

Figure BII.2. Cycle de croissance microbienne.

Figure BII.3. Evolution des processus de développement microbiens en fonction de l'activité de l'eau.

Figure BII.4. Effet de la concentration de divers humectants sur l'activité de l'eau (a_w) avec PG : propylène glycol ; EtOH : éthanol ; NaL : lactate de sodium ; NaCl : chlorure de sodium.

Figure BII.5. Effet du pH sur la dissociation de plusieurs acides faibles que sont les acides benzoïque, sorbique et propionique.

Figure BII.6. Effet combiné de l'activité de l'eau (a_w) et du pH sur la croissance de *Clostridium botulinum* de type G incubé à 32°C.

Figure BII.7. Représentation de la quantité de méthylparaben libre par rapport à celle non libre en fonction de la concentration en polysorbate 80. A. : 3% en polysorbate 80 ; B. 5% en polysorbate 80 ; C. 10% en polysorbate 80.

Figure BII.8. Représentation du rapport de la quantité en agent antimicrobien totale/libre noté R, en fonction de la concentration en polysorbate 80.

Figure BII.9. Effet combiné de la nisine et du thymol sur la croissance cellulaire de *Bacillus subtilis* avec OD : densité optique à 660nm.

Tableau BII.1. Caractéristiques des différents types de micro-organismes.

Tableau BII.2. Critères d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne d'un produit cosmétique (norme NF EN ISO 11930). Avec NI = No Increase c'est-à-dire pas d'augmentation de la population microbienne par rapport au temps d'analyse précédent.

Tableau BII.3. Spectre d'activité de certains agents antimicrobiens couramment utilisés.

Tableau BII.4. Valeurs des activités de l'eau (a_w) minimales permettant la croissance de certains micro-organismes représentatifs à 25°C.

Tableau BII.5. Valeur du pH minimum, optimal et maximum de croissance pour différents micro-organismes.

Chapitre III

Figure BIII.1. Marché global en millions de dollars des conditionnements actifs entre 2001 et 2010.

Figure BIII.2. Croissance de *Listeria monocytogenes* en fonction du mode de délivrance avec : (●) le contrôle en absence de nisine ; (▲) l'addition instantanée de 200UI/mL de nisine ; (△) l'addition lente de 1000UI/mL de nisine ; (▽) l'addition combinée instantanée de 200UI/mL et lente de 500UI/mL de nisine.

Figure BIII.3. A. Conditionnement avec sachet antimicrobien ; B. agent antimicrobien intégré au sein du matériau de conditionnement ; C. agent antimicrobien enduit à la surface du conditionnement ; D. agent antimicrobien adsorbé à la surface du conditionnement ; E. agent antimicrobien immobilisé à la surface du conditionnement par liaisons covalentes ; F. agent antimicrobien immobilisé à la surface du conditionnement par liaisons ioniques ; G. matériel de conditionnement ayant des propriétés antimicrobiennes intrinsèques.

Figure BIII.4. Effet d'un conditionnement antimicrobien sur *Aspergillus niger* mesuré par la méthode des milieux gélosés.

Tableau BIII.1. Exemples de différents conditionnements antimicrobiens commerciaux pour le domaine agro-alimentaire.

Tableau BIII.2. Liste des agents antimicrobiens incorporés au sein des conditionnements antimicrobiens ou à leur surface.

Tableau BIII.3. Avantages et inconvénients des différentes méthodes de fonctionnalisation du conditionnement primaire.

Etude expérimentale

Chapitre I

Figure 1. Abbreviation codes for the batch names.

Figure 2. SEM pictures of PCL microparticles illustrating the different morphologies obtained in various experiments.

Figure 3. SEM pictures of the internal structure of fractured holy PCL microparticles showing the presence of large cavities behind the surface holes. A and B: Microparticles of 45-10-PVA-T cut with a microtome at -45°C showing the presence of voids in the center of the particles; picture B shows a void adjoining a hole at the surface of the microparticles. C and D: Freeze-fractured microparticles of 45-20-PVA-T showing the large voids in case of extensive formation of holes and cracks at the surface of microparticles.

Figure 4. Pictures of coalescence phenomena observed *in situ* with the video probe. The arrows show the droplets under coalescence events.

Figure 5. Variation of the mean droplet diameter d_{32} with respect to the viscosity of the oil phase η_D for the three flat blades propeller (blue circles) and the marine propeller (red squares). The dashed lines mark the prediction of the limiting droplet size for inviscid oil calculated from the Kolmogorov microscale (Eqs 6 and 7). The solid line of slope $3/4$ is the limiting behavior for highly viscous oils.

Figure 6. *In situ* pictures recorded with the video probe for the 80-10-PVA-T experiment: A: emulsification step, B: evaporation step.

Figure 7. Effect of the addition of polysorbate 80 on the mean diameter of PCL microparticles: A: emulsion droplets; B: microparticles.

Figure 8. Release profiles of cholecalciferol from microparticles of different morphologies ($n = 3$): A: microparticles of PCL₄₅₀₀₀; B: microparticles of PCL₈₀₀₀₀.

Figure 9. Results of the Higuchi's model applied on the drug release experiments.

Table 1. Effect of the PCL concentration and molar mass on the mean diameters of the emulsion droplets and dry microparticles.

Table 2. Influence of the experiment formulation and processing parameters on the solvent evaporation rate.

Table 3. Effect of the PCL concentration and molar mass on the organic phase viscosity.

Table 4. Interfacial tensions between DCM and aqueous phases of different surfactant compositions.

Table 5. Polysorbate 80 and PVA partition coefficient measurement between water and DCM.

Table 6. Drug release experiments: microspheres size, drug loading, Higuchi's release rate constant, and surface state morphology.

Chapitre II

Figure 1. SEM photograph of PMMA microparticles.

Figure 2. Film thickness as a function of the withdrawal speed in the absence of thickening agent resulting in a viscosity of the coating suspension of 40.1 mPa.s.

Figure 3. Film thickness as a function of the viscosity of the dipping suspension at a withdrawal speed of 0.44 m.s⁻¹.

Figure 4. PEA content of the films as a function of their thicknesses.

Figure 5. SEM photographs showing polyurethane film containing microparticles loaded with PEA.

Figure 6. Cumulative PEA release kinetics depending on the formulation. Left: Released amount as a function of time, t . Right: Released amount as a function of $t^{1/2}$. Green triangles: pure polyurethane binder; blue crosses: free PMMA microparticles in aqueous suspension; brown diamonds: film of 455.3 μm thickness; red squares: film of 750.8 μm thickness; orange circles: film of 879.6 μm thickness. Solid lines are the theoretical best fits to the short time data.

Table 1. Formulation parameters of the coating suspension for films used in the APE release experiments.

Table 2. Parameters of the films used in release experiments.

Chapitre III

Figure 1. Effect of the polysorbate 80 concentration on the micelles hydrodynamic radius.

Figure 2. Evolution of the fraction of free PEA in the water as a function of the polysorbate 80 concentration.

Figure 3. PEA total concentration necessary to ensure the A criterion for the microbiological protection as a function of the formulation.

Table 1. Abbreviations and formulation composition of water based sample tested for microbiological protection.

Table 2. Evaluation criteria of the antimicrobial efficiency described in the NF EN ISO 11930. NI: no increase compared to the previous analysis. Results are expressed as the logarithm of decrease of the tested microorganism.

Table 3. Measurements of the oil/water partition coefficients as a function of the PEA concentration.

Table 4. Theoretical PEA content in the different phases of $Em\ 0.25$ calculated using eq.3 compared with experimental measurements.

Table 5. Measurement of the microbiological criteria for several selected formulations.

Introduction générale

Contexte

La directive cosmétique n° 86/199/CEE du 26 mars 1986, Annexe IV modifiée, et plus récemment le règlement CE n°1223/2009 définissent les agents conservateurs comme "des substances ajoutées à des produits cosmétiques principalement pour inhiber le développement de micro-organismes". L'usage d'agents antimicrobiens, aussi appelés conservateurs, est donc primordial afin de conférer au produit une durée de vie suffisante et d'assurer au consommateur une sécurité maximale d'utilisation. Pour cela, ils sont utilisés dans de nombreux domaines que ce soit en cosmétique, pharmaceutique ou encore en agro-alimentaire [Brannan, 1995 ; Brul et Coote, 1995 ; Bean, 1972]. Cette notion de conservation n'est pas récente et pour ne citer que quelques exemples l'homme utilise depuis des siècles le sel et la fumée pour empêcher la viande et le poisson de se dégrader et le sulfate de cuivre était déjà utilisé en Egypte antique afin de conserver les fards à paupières [Mussard, 2006].

Les conservateurs n'ont pas tous le même spectre d'action ce qui justifie la liste des 56 conservateurs antimicrobiens recensés en Annexe VI de la directive cosmétique Européenne 76/768/CEE [Pittet et Boyce, 2001]. Cette liste fait également état des concentrations maximales autorisées dans les produits cosmétiques et les produits d'hygiène ainsi que des restrictions d'usage. En 2004, l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) anciennement dénommée Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) ainsi que la FDA (U.S. Food and Drug Administration) relevaient que les parabens étaient contenus dans près de 80% des produits cosmétiques mis sur le marché, de par leur large spectre d'activités, leur faible coût et leur innocuité [Pochet et Rousselle, 2004 ; Steinberg, 2004 ; Soni et al., 2001]. Or la même année Darbre et al., 2004 mesure la présence de molécules de parabens intacts au sein de cancers du seins. Il en résulte une polémique largement relayée médiatiquement questionnant l'innocuité des parabens présents dans la majeure partie des produits cosmétiques. Bien que sur l'ensemble de la littérature et des données de pharmacovigilance les parabens apparaissent peu toxiques et bien tolérés [Gazin, 2005], l'opinion publique et la consommation résultante s'en trouvent fortement influencées. De plus, outre les parabens, diverses études incriminent les conservateurs listés dans des réactions de sensibilisation de contact se manifestant notamment par l'apparition d'eczéma [Bleasel et al., 2002 ; Schnuch et al., 2011]. Le but est donc de protéger les formules mais aussi de limiter les effets secondaires engendrés par leur utilisation répétée. Bien qu'il

n'existe aucune obligation réglementaire, une pression médiatique forte se fait ressentir pour développer des produits sans parabens et même sans conservateurs ajoutés qui deviennent des arguments de vente reconnus [Varvaresou et al., 2009]. Pour autant, il reste nécessaire de garantir la protection antimicrobienne des produits pendant le stockage et lors de l'utilisation par le consommateur.

Une importante campagne de reformulation résulte de ce contexte médiatique non favorable aux parabens dont l'utilisation connaît une nette diminution entre 2010 et 2013 (figure 1) [Fiacre, 2014]. Cette reformulation massive des produits est également démontrée par un passage de 3 à 8% de la proportion de challenge tests non-conformes entre 2010 et 2012 expliqué par le spectre d'activité antimicrobien des nouveaux systèmes conservateurs inférieurs à celui des parabens (figure 2) [Fiacre, 2014]. La commercialisation de produits cosmétiques stables contenant la quantité minimale de conservateur nécessaire ou n'en possédant pas du tout représente donc aujourd'hui un réel besoin aussi bien qu'un véritable challenge technologique [Vermeiren et al., 2002]. Dans ce contexte, le conditionnement primaire joue un rôle majeur et doit être force de propositions. Les industriels du domaine rivalisent d'innovations afin de créer des conditionnements primaires innovants permettant de limiter voire même de supprimer la quantité en agents antimicrobiens introduits. Les années 2009 et 2010 ont notamment été marquées par l'arrivée sur le marché de produits qualifiés « sans conservateurs » grâce à des conditionnements primaires spécifiques. Ces solutions sont basées sur la notion de barrière physique, c'est-à-dire un conditionnement primaire étudié pour éviter la rétro-contamination du produit entre deux usages. Il est possible de citer le système DEFI commercialisé par Promens pour la marque de soins Avène, ou la pompe « Irrésistible » d'Aptar. Cependant ces deux types de conditionnements primaires sont onéreux de par un nombre de pièces assemblées élevé limitant leur application uniquement à des produits très sélectifs pour un marché haut de gamme. Le projet Stabipack dont a fait l'objet ces trois années de recherche se positionne sur un marché tout autre, avec la volonté de réaliser un conditionnement primaire fonctionnalisé à faible coût utilisant peu de pièces assemblées pouvant être utilisé sur le marché de la grande consommation. Ce conditionnement primaire antimicrobien a pour objectif de réduire la concentration en agents antimicrobiens au sein de la formule répondant ainsi à la demande des consommateurs et anticipant une législation en perpétuelle évolution restrictive.

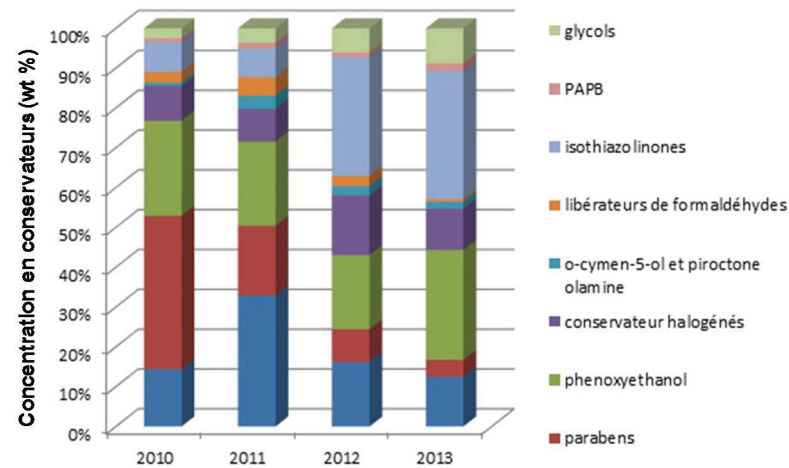


Figure 1. Evolution de la nature du conservateur et de la concentration utilisée dans les produits cosmétiques analysés par la société COSMEPAR entre 2010 et 2013 [Fiacre, 2014].

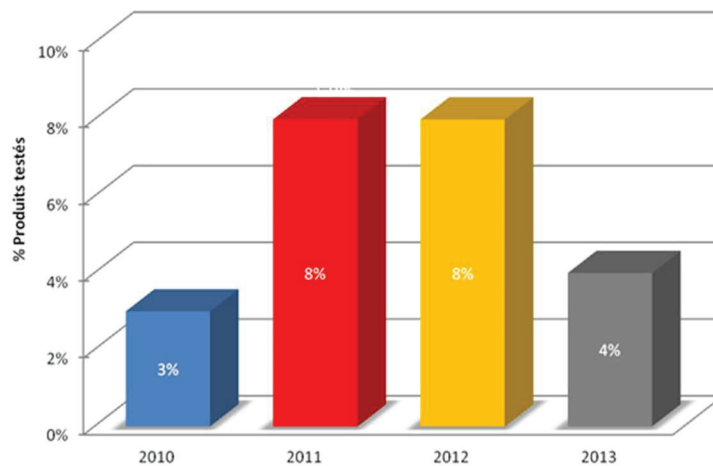


Figure 2. Evolution de la non-conformité des challenge tests pour les produits cosmétiques testés par la société COSMEPAR entre 2010 et 2013 (non conforme ou critère B) [Fiacre, 2014].

Le projet Stabipack

Le projet Stabipack est un projet du Fonds Unique Interministériel collaboratif regroupant 5 entreprises et 3 laboratoires publics ayant chacun sa spécialité :

- ALBEA : leader sur le marché des tubes et pots cosmétiques
- ACM Pharma : leader en microbiologie pour le contrôle de la qualité des produits cosmétiques

- PRP : spécialiste dans la production d'emballages cosmétiques
- PUMPART : spécialisé dans le développement de nouveaux systèmes anti-retour
- Strand Cosmetics Europe : prestataire de formulations cosmétiques
- IMP Université de Saint Etienne : expert en chimie des matériaux
- LAGEP Université de Lyon 1 : référent en physico-chimie et formulation
- PBS Université de Rouen : reconnu pour ses compétences en chimie des matériaux

Le projet Stabipack réunit donc des équipes de recherche venant de filières scientifiques très différentes permettant de répondre plus efficacement aux problématiques technologiques complexes.

L'enjeu du projet Stabipack est de mettre au point des produits cosmétiques préparés dans des conditions standards de fabrication, c'est-à-dire sans remplissage aseptique. De plus, les formulations contiendront un minimum de conservateurs et seront conditionnés dans des emballages multi-usages, le tout en garantissant des propriétés bactériostatiques sur l'ensemble de la durée de vie des produits. Cet objectif nécessite d'associer les deux démarches suivantes :

- *Au niveau du conditionnement primaire*: le développement de systèmes simples et peu onéreux utilisant des matériaux dits « fonctionnels » ou « actifs » possédant une activité antimicrobienne permettant de minimiser les risques de contamination microbiologique pendant l'usage. La fonctionnalisation du conditionnement primaire sera réalisée à des endroits ciblés, particulièrement sensibles à la contamination.
- *Au niveau de la formule cosmétique* : grâce à l'action localisée de l'emballage actif, la concentration en agent antimicrobien au sein de la formule sera réduite à la dose minimale de conservateur nécessaire pour assurer l'efficacité. Il a également été choisi de travailler avec des formulations auto-protégées, c'est-à-dire que le système de conservation sélectionné utilisera des agents antimicrobiens non listés dans l'annexe européenne bien qu'ayant des propriétés antimicrobiennes reconnues.

In fine, l'enjeu principal pour la filière cosmétique est de mettre sur le marché de la grande consommation, à l'horizon 2016, des produits innovants utilisant l'action combinée de la formulation et du conditionnement primaire:

- Adaptés à la demande du consommateur désirant des formulations allégées en agents antimicrobiens.
- Répondant aux enjeux de qualité et d'innocuité des produits
- Qui ne nécessitent pas de changements lourds sur les outils de production des fabricants et des conditionneurs
- Et qui anticiperont une réglementation renforcée au plan national et européen quant à la restriction de l'usage des conservateurs.

Le projet Stabipack vise ainsi à donner à l'industrie cosmétique française une position européenne de leader sur un marché en pleine évolution.

Les axes de recherche du projet de thèse

Afin de répondre aux critères du projet Stabipack, le travail réalisé par le LAGEP a utilisé l'alcool phényléthylique qui est un agent antimicrobien non listé en tant que conservateur dans l'Annexe VI de la directive cosmétique européenne mais qui possède des propriétés bactériostatiques [Lilley et Brewer, 1953]. L'alcool phényléthylique a été encapsulé au sein de microparticules afin d'apporter une libération d'antimicrobien contrôlée et prolongée dans le temps. Ces microparticules ont été enduites sur des surfaces spécifiques du conditionnement primaire grâce à l'action d'un liant. Ainsi il est obtenu un conditionnement fonctionnalisé possédant des propriétés antimicrobiennes au sein de zones ciblées, sensibles à la contamination. Enfin, il a été réalisé des travaux étudiant les relations prédictives entre dose et activité antimicrobienne dans le but d'ajuster les concentrations d'alcool phényléthylique introduites au sein de formulations à la quantité minimale permettant d'obtenir le niveau protecteur recherché.

Structure du manuscrit

Ce travail de thèse étudie trois axes de recherche qui se situent à l'interface entre deux disciplines différentes que sont : la physico-chimie et formulation ainsi que la microbiologie (figure 3).

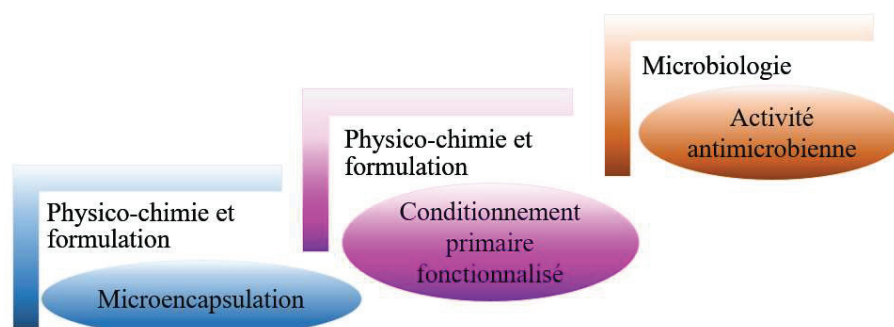


Figure 3. Représentation des différents domaines d'activité relatifs à la thèse.

L'**étude bibliographique** de ce manuscrit est divisée en trois parties reprenant chaque sujet d'étude qui ont fait l'objet de ce travail. Le *premier chapitre* présente les objectifs et domaines d'application de la microencapsulation ainsi que les différentes méthodes d'obtention de microparticules. Une attention particulière est ensuite portée sur la microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple qui est la technique choisie pour ce travail de thèse. Il a été réalisé un état de l'art concernant l'impact des paramètres de formulation et du procédé sur les caractéristiques des microparticules. Enfin, les facteurs influençant la cinétique de libération ont été détaillés.

Le *deuxième chapitre* de l'étude bibliographique est consacré à la protection antimicrobienne des formulations. Il y est notamment développé l'origine des contaminations et les souches microbiennes responsables ainsi que les agents antimicrobiens permettant de lutter contre le développement de ces micro-organismes. Une attention particulière a été portée sur les alternatives à l'utilisation d'agents antimicrobiens en utilisant notamment des paramètres de la formulation ou du conditionnement. Les facteurs impactant l'efficacité des agents antimicrobiens au sein des formulations sont également discutés.

Le *troisième* et dernier *chapitre* de l'étude bibliographique est consacré aux conditionnements actifs antimicrobiens avec un état de l'art des différents emballages existants. Les facteurs influant l'efficacité de ces conditionnements primaires fonctionnels sont également discutés. Enfin les tests microbiologiques permettant de démontrer l'effet antimicrobien sont présentés.

L'**étude expérimentale** présente les résultats obtenus répondant aux objectifs précédemment exposés. Le *premier chapitre* (sous forme de publication publiée) traite de l'étude des morphologies de microparticules de poly(ϵ -caprolactone) réalisées par

microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple. Il y sera notamment étudié les paramètres et mécanismes physico-chimiques influençant les dégradations morphologiques à partir de l'état de surface lisse et non poreux des microsphères. L'impact de l'état de surface sur la cinétique de libération est également étudié.

Le *deuxième chapitre* (sous forme de publication publiée) s'intéresse aux conditionnements primaires antimicrobiens fonctionnalisés grâce à une couche de microparticules enduite à la surface du conditionnement polyoléfine. Les différentes couches réalisées en fonction des paramètres du procédé de revêtement par immersion (*dip-coating*) ont été caractérisées. Les cinétiques de libération résultantes ont également été étudiées et comparées à celle obtenue pour un revêtement contenant l'agent antimicrobien non encapsulé dispersé au sein de la matrice liante.

Le *troisième chapitre* (sous forme de publication) décrit l'impact des paramètres de la formulation sur l'activité antimicrobienne de l'alcool phényléthylique. Il a été proposé un modèle mathématique permettant de calculer la quantité en agent antimicrobien nécessaire afin d'assurer la protection en fonction de son partage au sein des différentes phases d'une émulsion.

Les principaux résultats obtenus sont repris et discutés dans la partie **discussion générale, perspectives et conclusion**.

Références

- [Bean, 1972] Bean H.S., 1972. Preservatives for pharmaceuticals, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 23, 703–720.
- [Bleasel et al., 2002] Bleasel N., Tate B., Rademaker M., 2002. Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. *Austral. J. Dermatol.*, 43, 211–213.
- [Brannan, 1995] Brannan D.K., 1995. Cosmetic preservation, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 46, 199–200.
- [Brul et Coote, 1999] Brul S., Coote P., 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms, *Int. J. Food. Microbiol.*, 50, 1–17.
- [Darbre et al., 2004] Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J., Pope G.S., 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours, *J. Appl. Toxicol.*, 24, 5–13.
- [Fiacre, 2014] Fiacre J.L., 2014. Reformulation cosmétique : bilan, <http://www.cosmepar.fr/reformulation-cosmetique-bilan>.
- [Gazin, 2005] Gazin V., Unité veille toxicologique et évaluation non clinique, bulletin n°27 de vigilance de l'ANSM, anciennement dénommée Affsaps, de juin 2005
- [Lilley et Brewer, 1953] Lilley B.D., Brewer J.H., 1953. The selective antibacterial action of phenylethyl alcohol, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 42, 6–8.
- [Mussard, 2006] Mussard J., Les parabens, des conservateurs omniprésents: un risque pour la santé?, dissertation doctorale, 2006.
- [Pittet et Boyce, 2001] Pittet D., Boyce J. M., 2001. Hand hygiene and patient care: pursuing the Semmelweis legacy. *Lancet Infect. Dis.* 1, 9–20.
- [Pochet et Rousselle, 2004] Pochet A., Rousselle C., Unité veille toxicologique et évaluation non clinique, bulletin n°21 de vigilance de l'ANSM, anciennement dénommée Affsaps, de mai 2004.
- [Schnuch et al., 2011] Schnuch A., Lessmann H., Geier J., Uter W., 2011. Contact allergy to preservatives. Analysis of IVDK data 1996–2009. *Brit. J. Dermatol.*, 164, 1316–1325.

- [Soni et al., 2001] Soni M.G., Burdock G.A., Taylor S. L., Greenberg N. A., 2001. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. Food Chem. Toxicol., 39, 513–532.
- [Steinberg, 2004] Steinberg D.C., 2004. Frequency of use of preservatives 2003. Cosmet. Toiletries, 119, 55–58.
- [Vermeiren et al., 2002] Vermeiren L., Devlieghere F., Debevere J., 2002. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. Food Addit. Contam., 19, 163–171.
- [Varvaresou et al., 2009] Varvaresou A., Papageorgiou S., Tsirivas E., Protopapa E., Kintziou H., Kefala V., Demetzos C., 2009. Self-preserving cosmetics. Int. J. Cosmet. Sci., 31, 163–175.

Etude bibliographique

Chapitre I:

La microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple : influence du procédé et des paramètres de formulation

Chapitre II :

La conservation des formulations

Chapitre III :

Les conditionnements actifs antimicrobiens

Etude bibliographique

Chapitre I:

La microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple : influence du procédé et des paramètres de formulation

Introduction

L'encapsulation est vectrice d'innovations de par ses avantages de protection et de libération contrôlée dans l'espace et dans le temps. La force de l'encapsulation peut se résumer en un mot : le choix. Chaque nature physico-chimique d'actif peut être encapsulée avec succès grâce à plusieurs techniques disponibles et la possibilité de sélectionner différents matériaux enrobants comme par exemple les cires, les protéines, les phospholipides ou encore les polymères. Différentes structures internes de microparticules sont réalisables avec des tailles qui peuvent être variables. La structure externe peut également être modifiée. Enfin, il est possible de choisir la forme physique finale des microparticules obtenues : solution diluée ou concentrée ou encore forme sèche sont autant de possibilités à prendre en compte. Tous ces paramètres auront un impact sur la cinétique de libération des particules. Avoir le choix n'implique donc pas forcément que la réalisation est simple car chaque méthode et matériau utilisés mènent à nombre de problématiques référencées dans la littérature.

Cette partie propose de faire un bref état de toutes les techniques de microencapsulation existantes. Elle a ensuite pour objectif de détailler la technique de microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple qui est la méthode utilisée pour ce travail de thèse. Il sera notamment étudié les divers paramètres influençant les caractéristiques des microparticules et les cinétiques de libération résultantes.

1. L'encapsulation

1.1 Définition et historique

Toute technique confondue, l'encapsulation permet l'emprisonnement de principes actifs sous formes solide, liquide ou gazeuse au sein d'un matériau support [Thies, 1987]. Elle résulte donc en la préparation de particules individualisées constituées d'un matériau enrobant contenant un principe actif. La matrice enrobante représente une barrière permettant la protection du principe actif ainsi que le contrôle de sa libération.

La première application basée sur la technologie de l'encapsulation a été commercialisée il y a 60 ans dans le domaine de l'imprimerie. Il s'agit du papier carbone sans carbone aussi appelé papier autocopiant permettant la duplication d'un texte ou d'une figure sous l'effet d'une faible pression [Green et al., 1956]. Ce produit contient des microparticules de colorant réalisées par coacervation complexe entre la gélatine et la gomme arabique qui se brisent sous l'effet de la pression d'une tête d'imprimante ou d'un stylo. A la fin des années cinquante la technologie de la microencapsulation fut utilisée dans le domaine pharmaceutique pour les médicaments analgésiques à libération prolongée par exemple, ainsi que pour d'autres applications industrielles telles que les colles [Vandamme et al., 2007]. Au cours des années

qui suivirent, la microencapsulation devint un domaine de recherche dynamique tant au niveau académique qu'industriel comme le démontre le nombre croissant d'articles scientifiques et de brevets publiés (Figure BI.1).

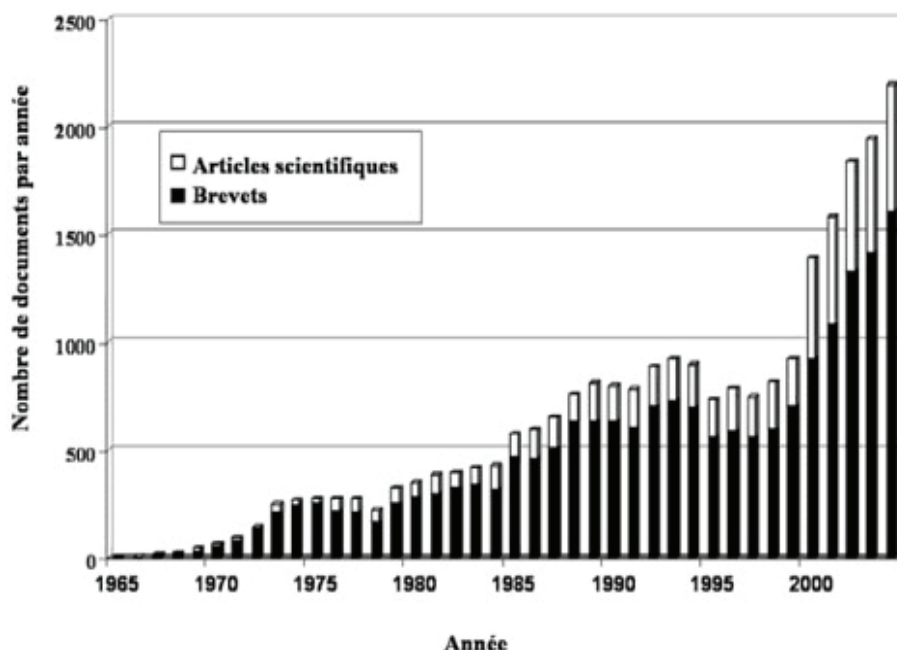


Figure BI.1. Evolution du nombre d'articles scientifiques et de brevets publiés par année dans le domaine de la microencapsulation [Vandamme et al., 2007].

1.2 Objectifs de l'encapsulation et domaines d'application

La technique d'encapsulation permet d'immobiliser le principe actif, de le protéger du milieu extérieur, de contrôler et cibler sa libération ou encore de le structurer [Poncelet, 2006].

➤ Immobiliser ou isoler

Cet objectif résulte souvent du désir de vouloir limiter le contact entre certaines parties d'un système. L'immobilisation est souvent utilisée pour des cellules microbiennes [Zhu, 2007]. En effet, leur confinement dans une membrane semi-perméable permet d'obtenir une activité optimum de par une isolation physique du milieu extérieur tout en maintenant un environnement interne hospitalier adapté pour leur croissance et leur métabolisme. Ce principe a été utilisé pour la commercialisation du complément alimentaire animal Biacton® par la société Bioarmor. En effet, ce produit contient des bactéries encapsulées par des polymères naturels afin d'améliorer la survie bactérienne au cours de l'élaboration de l'aliment et pendant la période de conservation. En outre, l'isolation apportée par l'encapsulation est très souvent utilisée pour des catalyseurs et l'utilisation de composés incompatibles [Poe et al., 2007].

➤ Protéger

De nombreux composés actifs sont fragiles et doivent être protégés du milieu extérieur. L'encapsulation permet leur protection vis-à-vis des contraintes appliquées. Les vitamines E et C sont très souvent encapsulées car elles sont sensibles à la dégradation par contact avec la lumière, la chaleur ou encore l'oxygène [Duclairoir et al., 2002 ; Yoo et al., 2006 ; Stevanović et al., 2007]. Par exemple, Marsanasco et al., 2011 ont démontré que les liposomes permettaient de protéger les vitamines E et C contre la dénaturation notamment avant et après la pasteurisation du jus d'orange. L'activité protectrice apportée par l'encapsulation est également utilisée dans le domaine médical. Par exemple, l'encapsulation de bactéries probiotiques, avec de l'alginate et du chitosan notamment, apporte une protection vis-à-vis des conditions gastro-intestinales et donc permet une libération de cellules bactériennes viables dans le colon [Chávarri et al., 2010]. Il est également possible de citer l'amélioration du diagnostic grâce à la protection amenée par l'encapsulation illustrée par les travaux de Navarro et al., 2012 qui ont reporté une amélioration des propriétés optiques grâce à l'encapsulation au sein de nanoparticules lipidiques du vert d'indocyanine qui est un agent contrastant.

➤ Vectoriser

La vectorisation par l'encapsulation permet de cibler l'action du principe actif. Par exemple, l'amélioration de la pénétration cutanée au travers du derme ou de l'épiderme peut être atteinte grâce à l'encapsulation. Il est possible de citer les travaux de Bourgeois et al., 2010 qui ont démontré une pénétration deux fois plus importante égale à 22,6% grâce à l'utilisation de particules contre 9,99% obtenues avec la caféine non encapsulée. Yang et al., 2003 ont également mesuré une amélioration de la pénétration transdermique de la vitamine C grâce à l'encapsulation dans les produits à applications topiques. Pour ce qui est du domaine médical, il est possible de citer les travaux menés par Gupta et Ravi, 2001 qui ont démontré que l'encapsulation de l'acide 5-aminosalicylique avec des Eudragit RL et RS permet d'assurer une libération dans le colon par dissolution des matrices polymériques à pH=6,5. La vectorisation apportée par l'encapsulation est également utilisée pour masquer le goût de certains actifs qui ne seront pas libérés dans la cavité buccale mais dans le système digestif. C'est notamment le cas en agroalimentaire avec l'huile de poisson [Anwar et Kunz, 2011] ou encore l'huile d'ail [Siow et Ong, 2013]. Dans le domaine pharmaceutique, il est possible de citer l'exemple de l'ibuprofène qui est également encapsulé à cause de son goût amer [Diego-Taboada et al., 2013].

➤ Contrôler la libération

Dans la majorité des cas, le but de l'encapsulation est d'établir un profil de libération spécifique [Freiberg et Zhu, 2004]. Par exemple, dans le domaine médical le traitement

oncoLAR permet la libération d'un agent anti-cancéreux progressif sur une période de 1 à 3 mois [Okada, 1997]. De même, Plosker et Brogden, 1994 ont démontré que le médicament *Lupron Depot*, traitant le cancer de la prostate, permet d'obtenir une libération contrôlée à un taux journalier de 2,8% pendant un mois après une administration sous-cutanée ou intramusculaire. L'industrie textile utilise également la microencapsulation, et ce afin de limiter l'évaporation des molécules volatiles et d'assurer une action prolongée. Il est possible de citer les textiles en coton contenant des insecticides encapsulés, comme l'huile essentielle de citronnelle par exemple, qui ont démontré présenter une libération supérieure par rapport aux vêtements traités avec une solution d'éthanol contenant l'huile essentielle non encapsulée. Il a été démontré que l'effet répulsif de ces textiles fonctionnalisés est supérieur à 90% pendant 3 semaines [Specos et al., 2010].

➤ Structurer

L'encapsulation d'un composé liquide dans des microparticules solides permet d'obtenir une modification de l'état physique de l'actif qui passe de la forme liquide à solide [Fuchs et al., 2006]. Cela permet par exemple une homogénéisation simplifiée du mélange de l'actif initialement liquide au sein d'une poudre [Leclercq et Reineccius, 2009].

2. Les microparticules : caractérisation

2.1 Taille

Le terme de microparticules est utilisé pour des tailles comprises entre 1 μ m et 1000 μ m d'après Benoit et al., 2013. Thies, 1987 réduit l'intervalle de définition des microparticules de 1 μ m à 500 μ m. Dans tous les cas, les particules ayant un diamètre inférieur à 1 μ m appartiennent au domaine des nanoparticules.

2.2 Structure interne

Deux types de structures internes de microparticules polymériques peuvent être observés :

- les microsphères qui sont des réseaux matriciels de matériau enrobant dans lequel se trouve dispersé ou dissout le principe actif (Figure BI.2A et BI.2B)
- les microcapsules qui sont des systèmes dits « réservoirs » constitués d'un cœur de principe actif entouré d'une membrane de matériau enrobant (Figure BI.2C)

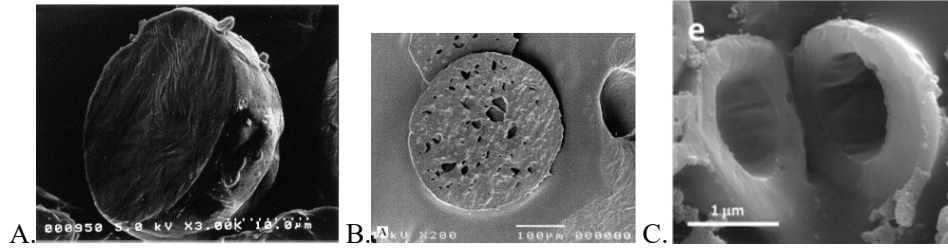


Figure BI.2. Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage représentant : A. microsphère dans laquelle le principe actif est dissout dans le matériau enrobant [Jeong et al., 2003] ; B. microsphère dans laquelle le principe actif est dispersé dans le matériau enrobant [Yang et al., 2001] ; C. microcapsule [Sanna et al., 2015].

2.3 Quantification de l'actif encapsulé

Le principe actif présent au sein des microparticules est caractérisé par plusieurs grandeurs [Gupta et Ravi, 2001 ; Shu et al., 2006]. La plus commune est le rendement d'encapsulation (*yield* en anglais) qui a pour formule :

$$\text{rendement d'encapsulation} = \frac{m(\text{microsphères obtenues}) (g)}{m(\text{polymère} + \text{principe actif introduits})(g)} \times 100 \quad [\text{BI.1}]$$

Il est aussi utilisé la teneur en principe actif (*loading* en anglais) ou taux d'encapsulation, qui est défini comme :

$$\text{teneur en principe actif} = \text{taux d'encapsulation} = \frac{m(\text{actif encapsulé}) (g)}{m(\text{particules}) (g)} \times 100 \quad [\text{BI.2}]$$

Enfin, l'efficacité d'encapsulation (*encapsulation efficiency* en anglais) est également un paramètre utilisé lors de la réalisation de microparticules :

$$\text{efficacité d'encapsulation} = \frac{\text{masse d'actif encapsulé} (g)}{\text{masse d'actif introduit} (g)} \times 100 \quad [\text{BI.3}]$$

Du fait de leur structuration, la teneur en principe actif encapsulé peut être très élevée dans les microcapsules, de l'ordre de 85 à 90 % (rapport massique). Celles rencontrées dans les microsphères sont plus faibles, de l'ordre de 20 à 35 % au maximum [Benoit et al., 2013].

3. Procédés de microencapsulation

Plusieurs procédés permettant l'encapsulation de principes actifs sont disponibles. A chaque technique correspondent un intervalle de tailles ainsi qu'un taux d'encapsulation et une structure interne différents. Il y a également diverses possibilités concernant la forme physique finale des microparticules qui peuvent être sous la forme de poudre ou de dispersion dans un liquide. La classification des techniques d'encapsulation disponibles la plus répandue s'intéresse principalement au principe même du procédé :

- **Les procédés mécaniques** sont basés sur le séchage ou la solidification de gouttelettes contenant tous les constituants de la future particule.
- **Les procédés chimiques** sont caractérisés par un déclenchement simultané de la synthèse de la membrane (ou de la matrice) et de l'encapsulation du principe actif. Les procédés chimiques n'utilisent donc pas de matrices enrobantes préformées.
- **Les procédés physico-chimiques** sont dépendants : (i) de la solubilité des agents enrobants sous l'effet de variations des conditions physiques (température, pH, ajout d'un non solvant ou d'un polymère incompatible...), (ii) de changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobants.

3.1 Procédés mécaniques

➤ Nébulisation-séchage par atomisation (*spray drying*)

La technique de nébulisation/séchage est un procédé continu en une étape permettant d'obtenir une poudre à partir d'une solution, d'une suspension liquide, ou encore d'une émulsion. Le principe de base consiste à pulvériser la formulation liquide à travers une buse d'atomisation sous forme d'un aérosol de fines gouttelettes de 5 à 500µm dans une enceinte. Les microgouttelettes formées sont mises en contact avec un flux d'air établi à contre-courant ou co-courant préalablement chauffé. Grâce à une surface d'échange importante l'évaporation du liquide est rapide ce qui permet la formation de microparticules solides. En effet, dans le cas d'une solution, le volume liquide diminuant, la concentration du produit dissout augmente et il y a apparition du solide par précipitation.

Ce procédé permet généralement l'obtention de microsphères de 1 à 50µm pour un séchage à co-courant. Les tailles moyennes obtenues pour un séchage à contre-courant sont plus importantes de l'ordre de 2 à 3mm à cause de l'agrégation des petites particules. Le taux d'encapsulation obtenu est inférieur à 40% [Gharsallaoui et al., 2007 ; Ré, 1998].

La technique de nébulisation-séchage est largement utilisée dans les industries pharmaceutiques pour les enzymes et les hormones de croissance [Broadhead et al., 1992, Maa

et al., 1998], ou encore dans le secteur agroalimentaire pour le menthol ou la vitamine C par exemple [Soottitantawat et al., 2005 ; Desai et al., 2005]. Cette technique ne peut cependant pas être utilisée avec des substances thermolabiles qui peuvent être endommagées durant l'augmentation de température inhérente au processus, c'est le cas par exemple des vitamines comme le α -tocophérol [Yoo et al., 2006].

➤ Enrobage en lit fluidisé (*spray coating*)

La technique d'enrobage en lit fluidisé utilise un courant d'air permettant la suspension des particules de principe actif à enrober. La solution liante est pulvérisée en spray grâce à une buse permettant la dispersion de fines gouttelettes de matériau enrobant à la surface des particules de principe actif. L'enrobage est réalisé par passages successifs et cycliques des particules dans les zones de pulvérisation et de séchage, et ce afin d'obtenir un enrobage continu et homogène des microparticules. Ce procédé nécessite des particules solides de principe actif ayant une distribution granulométrique assez étroite afin d'obtenir des enrobages homogènes et d'épaisseur contrôlée avec des particules non agglomérées. De plus, cette technique n'est pas adaptée à l'enrobage de particules dont la taille est inférieure à 100 μ m à cause de phénomènes d'agrégation au cours du procédé [Gouin, 2004]. L'épaisseur des films d'enrobage se situe généralement entre 1 μ m et 20 μ m, les films devant être suffisamment épais pour masquer les défauts de surface. Le taux d'encapsulation est généralement compris entre 60 et 90% [Jacquot et Perneti, 2003]. Cette technique a été adoptée par de nombreuses entreprises pharmaceutiques et agroalimentaires notamment pour l'utilisation d'ibuprofène, de paracétamol ou de vitamines dont le goût a été masqué de manière efficace en utilisant un enrobage avec la prolamine sans impact sur la biodisponibilité de la substance active [Sohi et al., 2004].

➤ Gélification ou congélation de gouttes (*prilling ou spray-congealing/cooling*) :

Pour ces deux techniques, les gouttes sont formées au travers d'une buse vibrante et sont recueillies dans un milieu permettant la gélification ou la solidification du matériau enrobant.

La gélification de gouttes est basée sur une solution, dispersion ou émulsion de matière active dans une solution aqueuse de polymère capable de former des gels sous une action extérieure physique (température) ou chimique (pH, présence d'un composé induisant la précipitation). Par exemple, une solution aqueuse d'alginate de sodium produit des gouttelettes après avoir traversée une buse vibrante. Ces gouttes se solidifient en se gélifiant dans une phase aqueuse contenant du chlorure de calcium afin d'encapsuler le principe actif dans les microsphères [Del Gaudio et al., 2009].

La technique de congélation consiste en la solubilisation ou la dispersion du principe actif dans un matériau enrobant à l'état fondu de type corps gras, glycéride ou cire à point de

fusion relativement bas compris entre 50°C et 120°C [Passerini et al., 2003]. La baisse de température entraîne l'encapsulation pendant la chute des gouttes sortant de l'orifice de la buse vibrante.

Les microsphères obtenues par les méthodes de gélification ou congélation de gouttes ont des diamètres compris entre 30µm et 800µm et le taux d'encapsulation se situe entre 10% et 50%. [Killeen, 1993 ; Albertini et al., 2008 ; Séquier, 2013]. Les inconvénients résident dans le bouchage de la buse, la gamme limitée de taille (>200µm) et le taux d'encapsulation faible

3.2 Procédés chimiques

➤ Polycondensation interfaciale en émulsion

La synthèse de microparticules par polycondensation interfaciale est réalisée à l'interface des gouttelettes d'émulsion eau dans huile ou huile dans eau. Chaque phase contient un monomère réactif qui réagit pour former une membrane polymérique autour de la gouttelette conduisant à la formation de microcapsules.

Dans ce procédé, on obtient des capsules ayant des diamètres compris entre 0,5 µm et 100 µm environ avec un taux de charge inférieur à 80% [Benoit et al., 2013 ; Mathiowitz, 1999]. Les caractéristiques finales dépendent notamment de la vitesse d'alimentation des deux monomères qui contrôle l'homogénéité de la membrane polymérique et sa distribution de masse moléculaire.

Cette technique est très utilisée pour l'encapsulation de molécules biologiques telles que les protéines. En effet, en fonction des conditions de réalisation des capsules la membrane formée peut être semi-perméable permettant des échanges maîtrisés avec l'extérieur [Janssen et al., 1993, Monshipouri et Neufeld, 1991].

➤ Polymérisation en milieu dispersé

Dans le cas de la polymérisation en milieu dispersé les microparticules se font à partir d'une phase homogène initiale comprenant les monomères et les matières actives solubilisées. Il se produit une nucléation en phase homogène qui résulte en la formation d'oligomères en croissance dans la phase continue. Lorsqu'ils ont atteint une longueur critique, les oligomères précipitent pour donner des agrégats qui sont stabilisés par des molécules tensioactives. Ces agrégats constituent les nucléus qui adsorbent le monomère et qui seront donc le lieu de croissance des particules finales de polymère [Charleux, 2000].

La taille des microsphères obtenues varie entre 1µm et 15µm et le taux d'encapsulation est inférieur à 50% [Benoit et al., 2013].

3.3 Procédés physico-chimiques

➤ Coacervation

Le procédé de microencapsulation par coacervation complexe peut être décomposé en quatre étapes [Madan et al. 1972, Gouin 2004]. La première étape consiste à former une émulsion ou dispersion dans laquelle la substance à encapsuler constitue la phase dispersée, et les matériaux d'encapsulation forment la phase continue. La séparation de phase des polymères au sein de la phase continue est induite par modification du milieu due à une variation de température, à l'addition d'un non-solvant, d'un électrolyte ou encore d'un second polymère incompatible. La modification du milieu résulte en l'augmentation des interactions polymère-polymère au détriment des interactions polymère-solvant provoquant ainsi la désolvatation du polymère. La coacervation correspond donc à un phénomène de désolvatation de macromolécules conduisant à une séparation de phases au sein d'une solution. On obtient ainsi le coacervat qui est une phase riche en polymère et pauvre en solvant qui se dépose à la surface des gouttelettes de principe actif. Lorsque le coacervat est composé d'un seul polymère, la coacervation est dite simple tandis que si deux polymères coexistent dans le coacervat il s'agit d'une coacervation complexe. Une étape de réticulation de l'enveloppe des microcapsules est souvent nécessaire à la fin du procédé d'encapsulation afin de solidifier la membrane et éviter ainsi un éclatement non désiré [Lazko et al., 2004 ; Mauguet et al., 2002].

La gélatine ainsi que les gommes d'acacia et de cellulose sont parmi les polymères les plus étudiés notamment pour le couple gélatine/gomme d'acacia [Ashardi, 1990 ; Madan et al. 1972, Junyaprasert et al. 2001, Lemetter et al. 2009]. Cette technique permet d'obtenir des microparticules de 5 à 200µm en moyenne et un taux d'encapsulation élevé qui peut aller jusqu'à 90% notamment pour la coacervation complexe [Benoit et al., 2013 ; De Kruif, 2004 ; Mathieu, 2003]. De plus, l'avantage de cette technique repose sur le fait qu'elle n'utilise peu ou pas de solvant organique. Cependant, le choix des matériaux est limité et restreint aux couples de polyélectrolytes de charges opposées et seuls les principes actifs hydrophobes peuvent être encapsulés.

➤ Gélification thermique d'émulsion (*hot melt*)

Le procédé de gélification thermique d'émulsion est réalisé à une température supérieure à la température de fusion du matériau enrobant. Le principe actif est dissout ou dispersé dans ce matériau fondu. Cette phase est ensuite émulsionnée au sein d'une phase dispersante préalablement chauffée à la même température. Cette méthode est applicable à l'encapsulation de principes actifs hydrophiles et lipophiles, en prenant en considération que le principe actif ne doit présenter aucune affinité avec la phase dispersante. A cet effet, pour les substances lipophiles l'eau distillée est généralement choisie comme phase dispersante, tandis

que pour les substances hydrophiles les huiles de silicone sont utilisées. La solidification des globules dispersés est obtenue en refroidissant brutalement le milieu.

Les microsphères obtenues suivant ce procédé ont une taille de 30µm à 300µm en général. Elles ont une teneur en principe actif de l'ordre de 20% [Benoit et al., 2013; Lin et Yu, 2000 ; Mathiowitz, 1999].

L'inconvénient réside en la formation de formes cristallines non souhaitées et l'altération physique des microsphères au cours du refroidissement. Cette technique peut être utilisée avec des matières actives à encapsuler très fragiles comme par exemple les levures en choisissant des matrices enrobantes caractérisées par un point de fusion peu élevé (environ 35°C) [Raymond et al., 2004].

➤ Evaporation/extraction de solvant en émulsion simple

La microencapsulation par évaporation de solvant fait intervenir :

- une phase organique contenant le polymère, le solvant ainsi que le principe actif à encapsuler qui est dissout ou dispersé
- une phase aqueuse contenant un agent stabilisant
- un système d'agitation plus ou moins cisailant
- un système d'évaporation à pression et température ambiantes ou à pression réduite

Le principe de la microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple repose sur deux étapes (Figure BI.3) [O'Donnell et McGinity, 1997 ; Li et al., 2008] :

- l'émulsification relative au mélange sous agitation des phases organique et aqueuse stabilisée grâce à l'agent stabilisant.
- l'étape d'évaporation durant laquelle le solvant passe de la phase organique à la phase aqueuse par gradient de concentration puis s'évapore à l'interface eau/air.

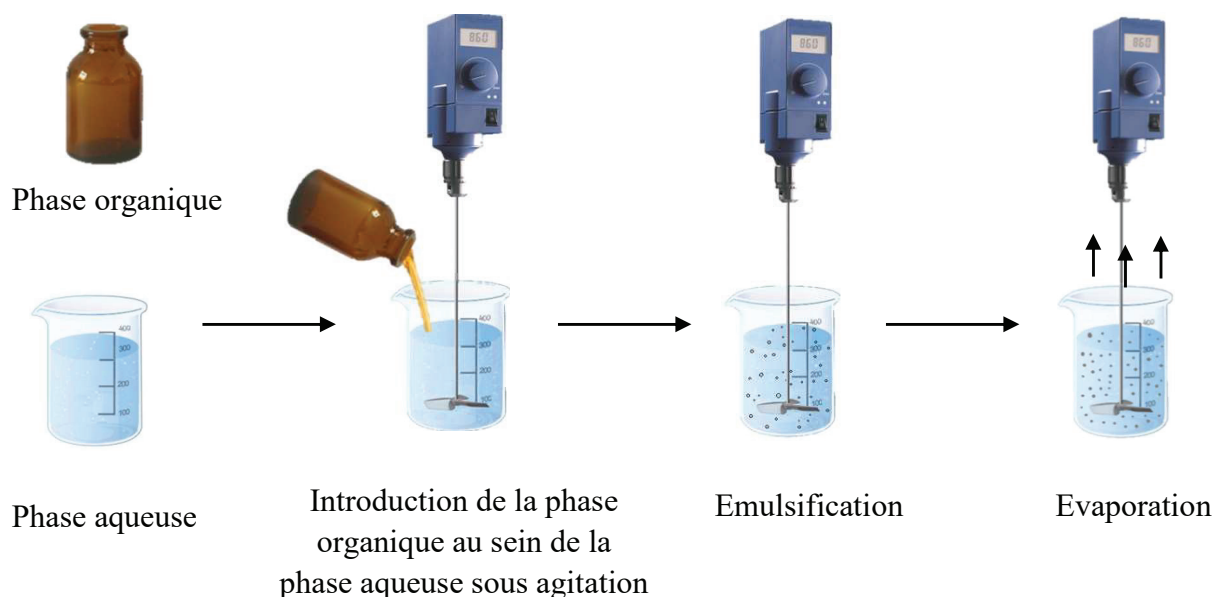


Figure BI.3. Schématisation des différentes étapes d'un procédé de microencapsulation par évaporation de solvant.

En s'appauvrissant en solvant, le polymère contenu dans les gouttelettes de phase organique précipite en encapsulant le principe actif. Il est donc obtenu des microsphères qui pourront être filtrées ou laissées en suspension. S'il ne se produit aucun phénomène de déstabilisation, la taille des particules sera directement fonction de la taille des gouttelettes d'émulsion. De plus, les conditions d'évaporation doivent être sélectionnées de manière rigoureuse dans le but d'obtenir des particules contenant le solvant à l'état de traces afin de respecter les limites des réglementations en vigueur.

Dans le cas d'une encapsulation de principe actif hydrophile la méthode d'évaporation de solvant en émulsion simple mentionnée précédemment nécessite quelques modifications. En effet, lors de l'émulsification il s'effectue un partage entre la phase organique et la phase aqueuse qui résulte en la perte du principe actif en faveur de la phase aqueuse externe. Des alternatives sont possibles de par l'utilisation de co-solvant au sein de la phase organique, comme l'éthanol ou le méthanol par exemple, dans lequel l'actif sera soluble [Pandya et al., 2008]. L'eau de la phase externe peut également être remplacée par une huile afin de limiter la solubilité de l'actif au sein de la phase externe et ainsi réduire les pertes. Enfin, il est également possible de réaliser une émulsion double dans laquelle l'actif sera solubilisé dans l'eau de la première émulsion eau/huile qui sera ensuite dispersée dans une solution aqueuse contenant un agent de surface pour réaliser une émulsion double de type eau/huile/eau. Cette dernière technique est plus difficile à mettre en place et peut entraîner des problèmes d'instabilité avec notamment une coalescence partielle des gouttelettes aqueuses internes résultant en des particules poreuses [Perez et al., 2000 ; Witchi et Doelker al., 1998 ; Schugens et al., 1994].

Le tableau BI.1 répertorie quelques exemples de principes actifs hydrophiles et hydrophobes encapsulés par la méthode d'évaporation de solvant. Il référence également plusieurs polymères couramment utilisés en microencapsulation de par leurs propriétés intéressantes de biodégradabilité et/ou de biocompatibilité telles que les l'acide poly(lactique-co-glycolique) ou encore l'acide polylactique. La biocompatibilité désigne un polymère physiologiquement toléré et qui ne cause pas d'effets indésirables locaux ou systémiques après l'administration. La biodégradabilité signifie que le polymère est dégradé en composants soit métabolisables soit excrétables. Les propriétés de biodégradabilité et biocompatibilité sont essentielles pour des applications pharmaceutiques notamment.

Tableau BI.1. Exemples de principes actifs hydrophiles et hydrophobes encapsulés par la méthode de microencapsulation par évaporation de solvant.

Nature du principe actif	Principe actif encapsulé	Méthode d'encapsulation	Polymère de la matrice enrobante	Référence
Principe actif hydrophile	albumine de sérum bovin	huile/huile	mélange de PLA et PEG	Jiang et Schwendeman, 2001
		huile/eau	PCL	Jameela et al., 1997
			PLG	Castellanos et al., 2001
		eau/huile/eau	PLGA	Crotts et Park, 1997
			PCL	Benoit et al., 1999
			PCL et PLGA	Yang et al., 2001
Principe actif hydrophobe	Insuline	huile/huile	PLGA	Hamishehkar et al., 2009
		eau/huile/eau	PLGA	Rosa et al., 2000
			PLGA	Yamaguchi et al., 2002
	lidocaïne	huile/huile	Eudragit S100	Obeidat et Prce, 2006
		huile/eau	PLA et PDLLA	Chung et al., 2001
			PLA	Lalla et Sapra, 1993
	ibuprofène	huile/eau	PLGA	Fernández-Carballido et al., 2004
			EC	Bodmeier et Chen, 1989
			PLA, PCL, P(LA-b-CL)	Zhu et al., 2005
			EC	Dubernet et al., 1991
	indométhacine	huile/eau	Eudragit RL, Eudragit RS, EC, Polystyrène, PMMA	Bodmeier et Chen, 1989
			PLGA	Conti et al., 1995
		huile/eau et eau/huile	Eudragit RL, Eudragit RS	Malamataris et Avgerinos, 1990

Abréviations : PEG : polyéthylène glycol ; PCL : poly(ϵ -caprolactone) ; PLG : poly(lactide-co-glycolide) ; PLGA : acide poly(lactique-co-glycolique) ; PLA : acide polylactique ; PDLLA : poly(DL-acide lactique) ; P(LA-b-CL) : copolymère d'acide polylactique et de poly(ϵ -caprolactone) ; EC : éthylcellulose ; PMMA : polyméthacrylate de méthyle.

Le procédé de microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple permet la fabrication de microsphères qui ont une taille généralement comprise entre 0,5 et 200 μ m. La teneur maximale en principe actif est inférieure à 25% [Benoit et al., 2013 ; Li et

al., 2008 ; Freitas et al., 2005]. Ce procédé est très utilisé de par ses conditions de réalisation aisées utilisant généralement des systèmes d'agitation usuels ainsi que des conditions ambiantes de température et de pression [Kim et al., 2005]. L'inconvénient de cette technique réside dans le fait qu'elle nécessite l'utilisation de solvants organiques laissant des traces non négligeables dans les microsphères obtenues [Li et al., 2008].

Sans être exhaustif, cet aperçu des grandes techniques d'encapsulation résumées dans le tableau BI.2 montre que chaque procédé génère des particules avec des caractéristiques différentes. La technique ainsi que la formulation sont donc à sélectionner rigoureusement en fonction du cahier des charges de l'application future. Différents paramètres seront notamment étudiés avec attention :

- la taille moyenne des microparticules ainsi que leur polydispersité
- la structure interne des particules
- la teneur en principe actif
- l'état de surface
- la cinétique de libération
- la stabilité au stockage
- les obligations réglementaires en vigueur en fonction du domaine d'application et du mode d'administration
- les contraintes de fabrication et le coût

Tableau BI.2. Caractéristiques des différentes méthodes d'encapsulation (adapté à partir de [Kerdudo, 2014](#)).

Technique	Avantages	Inconvénients	Classification des particules	Nature et forme physique des actifs encapsulés
Nébulisation/séchage (<i>spray drying</i>)	Technique simple Temps de procédé court Absence de réaction chimique	Perte de matières premières par adhérence aux parois de l'appareillage Non applicable aux systèmes de viscosité trop élevée Morphologies finales avec défauts ou déformations	Microsphère	Hydrophile ou hydrophobe, liquide ou solide
Procédés mécaniques				
Emrobage en lit d'air fluidisé (<i>spray coating</i>)	Absence de réaction chimique Films d'emrobage uniformes	Granulométrie initiale élevée avec une distribution étroite (>100µm) Agglomération	Microcapsule	Hydrophile ou hydrophobe, solide
Géification ou congélation de gouttes (<i>prilling</i>)	Particules denses et non poreuses Technique simple Absence de réaction chimique Utilisation de substances actives thermolabiles Absence de solvant Temps de procédé court	Taux d'encapsulation faible Bouchage de la buse	Microsphère	Hydrophile ou hydrophobe, liquide ou solide
Procédés chimiques				
Polycondensation interfaciale en émulsion	Contrôle de l'épaisseur de la paroi ainsi que de la masse moléculaire des chaînes formées	Possibilité de réactions chimiques non contrôlées entre la matière active et les monomères Nombreux lavages nécessaires	Microcapsule	Hydrophile ou hydrophobe, liquide
Polymerisation en milieu dispersé	Coût faible Équipement usuel		Microsphère	Hydrophile ou hydrophobe, liquide
Coacervation simple ou complexe	Absence de solvant organique Utilisation de matériel usuel et de conditions ambiantes	Agents réticulants classiques toxiques (géluraldéhyde)	Microcapsule (microsphère possible pour coacervation)	Hydrophobe, liquide
Géification thermique d'émulsion (<i>hot melt</i>)	Utilisation de substances actives thermolabiles Technique simple Particules denses et non poreuses Absence de solvant Temps de procédé court	Formes cristallines non souhaitées lors du refroidissement en fonction de la matrice utilisée	Microsphère	Hydrophile ou hydrophobe, liquide ou solide
Procédés physico-chimiques				
Évaporation/extraction de solvant	Utilisation de matériel usuel et de conditions ambiantes Technique simple	Utilisation de solvants organiques toxiques et présence de solvant résiduel	Microsphère	Hydrophile ou hydrophobe, liquide ou solide

L'étude faisant l'objet de ce manuscrit concerne la technique de microencapsulation par évaporation/extraction de solvant en émulsion simple qui sera développée plus spécifiquement dans la partie suivante.

4. La microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple

Les propriétés des microparticules varient en fonction des paramètres de formulation et du procédé tels que la nature du polymère et du principe actif, la vitesse d'agitation, la viscosité de la phase dispersante, la concentration en agents stabilisants et les conditions d'évaporation. Par exemple, à même procédé d'encapsulation et polymère enrobant utilisés, les morphologies des microparticules obtenues peuvent être très différentes (Figure BI.4). De même, les tailles et taux d'encapsulation sont variables. Il semble donc intéressant d'étudier l'influence de chaque facteur sur les caractéristiques des particules et sur leur cinétique de libération au regard de la littérature.

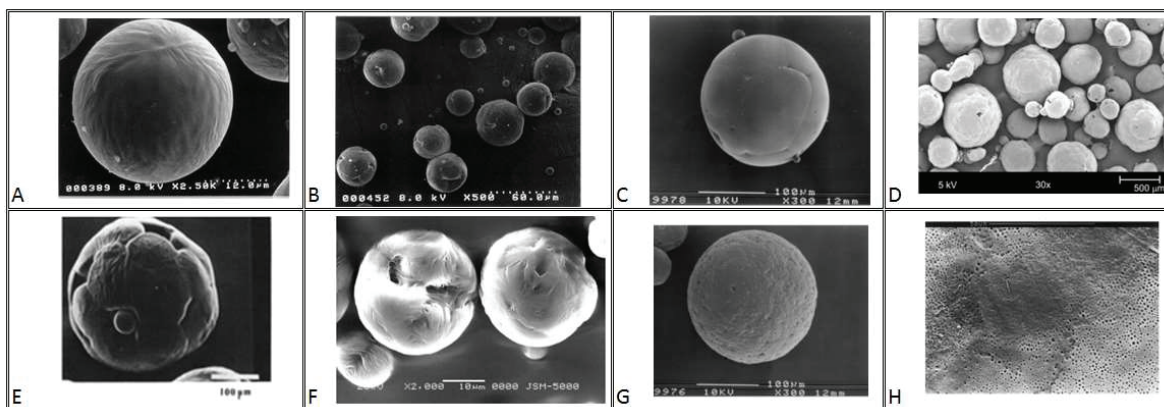


Figure BI.4. Exemples de morphologies de microparticules: A. lisses [Jeong et al., 2003] ; B. avec des cicatrices et des défauts [Jeong et al., 2003] ; C. avec des cicatrices [Le Ray et al., 2003] ; D. rugueuses [Suave et al., 2010] ; E. trouées [Dubernet et al., 1987] ; F. trouées [Zhu et al., 2005] ; G. poreuses [Le Ray et al., 2003] ; H. zoom sur une surface poreuse [Perez et al., 2000].

4.1 Impact des paramètres de formulation sur les caractéristiques des microparticules

4.1.1 Le solvant

La formation des microsphères repose sur un processus de séparation de phase dans lequel une solution polymérique est transformée en sphères solides précipitées grâce à la diffusion du solvant au sein de la phase aqueuse puis à son évaporation à l'interface eau/air. Le solvant utilisé dans la phase organique de la technique de microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple tient donc un rôle primordial et répond à plusieurs caractéristiques. Il doit :

- pouvoir dissoudre le polymère utilisé pour la matrice des particules
- avoir une faible solubilité au sein de la phase aqueuse externe
- être caractérisé par une volatilité élevée afin de permettre une expérimentation rapide et un résiduel faible au sein des microparticules formées
- avoir une faible toxicité

L'utilisation de solvants miscibles avec la phase aqueuse externe peut parfois être obligatoire selon la solubilité du principe actif. Dans ce cas, plusieurs alternatives sont possibles [Li, 2009]:

- la phase continue est pré-saturée avec le solvant [Bahl et Sah., 2000]
- la phase dispersée est d'abord émulsifiée dans la phase continue en petite quantité. Après la formation des gouttelettes cette émulsion est versée dans un volume important de phase continue [Freytag et al., 2000]
- la phase dispersée est émulsifiée dans une faible quantité de la phase continue agitée en continu pour procéder à l'évaporation [Sah, 1997]

Quatre différents solvants sont majoritairement utilisés (Tableau BI.3). Il s'agit du chloroforme, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle ou encore du formate d'éthyle. Concernant le chloroforme, de par sa toxicité et sa faible pression de vapeur il tend à être remplacé par le dichlorométhane. L'acétate d'éthyle ainsi que le formate d'éthyle ont l'avantage d'être moins toxiques mais sont partiellement solubles dans l'eau. Le dichlorométhane de par sa pression de vapeur saturante très élevée et sa faible température d'ébullition est caractérisé par une volatilité importante et donc une évaporation rapide lors du procédé. Il a cependant une toxicité supérieure à l'acétate d'éthyle ainsi qu'au formate d'éthyle et il est également déclaré comme cancérigène par l'agence de protection de l'environnement.

Tableau BI.3. Caractéristiques des principaux solvants utilisés dans la littérature pour le procédé de microencapsulation par évaporation de solvant.

Solvant	Pression de vapeur saturante à 20°C (mbar)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité dans l'eau à 20°C (g/L)	Toxicité	Références
Chloroforme	212	61	8	Toxicité élevée (> dichlorométhane)	Bolourtchian et al., 2005; Huang et al., 1997; Suave et al., 2010
Dichlorométhane (chlorure de méthylène)	453	37,9	20	Toxicité élevée	Al Haushey et al., 2007; Kim et al., 2005; Dordunoo et al., 1995; Aberturas et al., 2002; Benoit et al., 1999; Pérez et al., 2000
Acétate d'éthyle	100	77	90	Faible toxicité	Freytag et al., 2000; Sah, 1997;
Formate d'éthyle	259	54	105	Faible toxicité	Kim et al., 2005; Sah, 2000

➤ Influence sur la taille des microsphères

La composition du solvant est un facteur influençant la taille finale des microsphères. Kim et al., 2005 et Maia et al., 2004 ont prouvé que l'utilisation de solvant ayant une solubilité importante dans l'eau en combinaison avec des solvants peu solubles permet de diminuer la taille des particules obtenues. Pour Kim et al., 2005 les tailles moyennes de microsphères de poly(ϵ -caprolactone) résultantes de l'utilisation du dichlorométhane sont de 73,5 μ m comparées à celles obtenues avec un mélange de dichlorométhane et de formate d'éthyle qui sont à 56,6 μ m. De même, Maia et al., 2004 ont démontré que les particules du copolymère de polyhydroxybutyrate-hydroxyvalérate ont un diamètre moyen de 22,2 μ m avec le chloroforme réduit à 15,2 μ m de par l'ajout d'acétone. Ceci est expliqué par le fait que le formate d'éthyle et l'acétone ont une miscibilité avec l'eau supérieure à celle du dichlorométhane et du chloroforme respectivement. De ce fait, lors de la formation des gouttelettes d'émulsion le formate d'éthyle et l'acétone diffusent rapidement vers la phase aqueuse externe permettant une solidification des gouttelettes plus rapide. Ceci permet d'éviter des phénomènes éventuels de coalescence ou d'agrégation qui augmenteraient la taille des particules obtenues.

➤ Influence sur la morphologie

Le solvant utilisé au sein de la phase organique joue un rôle primordial sur la morphologie des microsphères. En effet, les solvants partiellement miscibles avec l'eau ne forment généralement pas de gouttelettes mais des larges agglomérats irréguliers de polymère pendant l'émulsification à cause des échanges rapides entre la phase organique et la phase aqueuse externe [Freytag et al., 2000 ; Herrmann et Bodmeier, 1998]. Au contraire, Bodmeier

et McGinity, 1988 ont démontré que la haute immiscibilité du dichlorométhane avec l'eau confère aux particules réalisées une forme sphérique.

➤ Influence sur le taux d'encapsulation

Le taux d'encapsulation est largement influencé par le type de solvant organique utilisé [Bodmeier et McGinity, 1988]. Cela peut être expliqué par l'influence du solvant sur le taux de précipitation du polymère à l'interface des gouttelettes. En effet, l'actif se partage entre la phase aqueuse et la phase organique tant que la gouttelette est dans un état liquide non précipité [Bodmeier et McGinity, 1987]. Lorsque le polymère à la surface des gouttelettes précipite, la perte d'actif ne se produit plus. La précipitation du polymère, entraînant la formation de microparticules, peut être plus ou moins rapide et elle est reliée à la solubilité du solvant organique dans la phase aqueuse externe. Afin d'obtenir un taux d'encapsulation élevé il est donc primordial de sélectionner les caractéristiques du solvant de manière à ce qu'il permette une précipitation rapide du polymère tout en limitant la perte de principe actif. Bodmeier et McGinity, 1988 ont prouvé que le contenu en sulfate de quinine dans l'acide polylactique ne variait plus après 2 minutes d'émulsification prouvant que le polymère dans le dichlorométhane précipite rapidement à la surface externe des gouttelettes d'émulsion, ce qui empêche la diffusion de l'actif vers la phase aqueuse. Herrmann et Bodmeier, 1998 ont quant à eux prouvé que l'utilisation de dichlorométhane confère aux particules réalisées une efficacité d'encapsulation élevée de 82,5% par rapport aux 63,7% obtenus avec l'acétate d'éthyle. Cela est probablement dû à la solubilité élevée de l'acétate d'éthyle dans l'eau qui entraîne la perte du principe actif vers la phase aqueuse externe lors de la diffusion du solvant organique.

4.1.2 Le principe actif

Dans le cas de la microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple, un partage du principe actif entre la phase aqueuse et la phase organique s'opère lors de l'émulsification [Bodmeier et McGinity, 1987]. Cette technique impose donc l'utilisation d'un principe actif lipophile afin de limiter les pertes au sein de la phase aqueuse externe. En effet, les actifs hydrophiles tels que la caféine, l'acide salicylique ou encore l'insuline et l'albumine de sérum bovin migrent préférentiellement vers le milieu aqueux externe. Au contraire, les actifs hydrophobes se partagent davantage en faveur de la phase organique. Le processus de partage et donc de perte de l'actif se produit principalement durant les premiers instants de l'émulsification car le polymère précipite rapidement en périphérie des gouttelettes ce qui limite les pertes [Bodmeier et McGinity, 1988]. Cependant, il n'en reste pas moins que le taux d'encapsulation s'en trouve modifié : les principes actifs hydrophiles ne seront que très peu encapsulés [Bodmeier et McGinity, 1987] alors que le taux d'encapsulation sera nettement meilleur lorsque l'actif est hydrophobe [Sansdrap et Moës, 1993 ; Liggins, 2000]. Dans leurs travaux, Dordunoo et al., 1995 obtiennent des taux d'encapsulation supérieurs à 95% qu'ils

expliquent par le fait que le taxol est un principe actif hydrophobe qui va se partager préférentiellement en faveur de la phase organique. Perez et al., 2000 ont également démontré que le taux d'encapsulation en utilisant le même procédé était 2,5 fois moins important pour le chlorhydrate de propranolol par rapport à la nifedipine dû à la solubilité relative des actifs au sein de la phase aqueuse externe.

Des solutions sont envisageables afin de limiter la solubilité des principes actifs hydrophiles au sein de la phase aqueuse externe et ainsi augmenter le taux d'encapsulation. Dans le cas d'actifs ionisables le degré d'ionisation de l'actif et le pH de la phase aqueuse externe sont des paramètres critiques. Concernant le chlorhydrate de propranolol par exemple, la diffusion et la perte peuvent être diminuées en ajustant le pH de la phase aqueuse externe à une valeur où la substance active n'est que très faiblement ionisée c'est-à-dire au-dessus du pKa [Perez et al., 2000]. Il a en effet été démontré que seulement 2% de chlorhydrate de propranolol était encapsulé dans les particules d'éthylcellulose à pH=5 contre 50% obtenus à pH=12 [Jones et Pearce, 1995]. De même, Bodmeier et McGinity, 1988 ont prouvé que l'encapsulation de quinidine au sein d'acide polylactique à pH=7 ne produisait pas de microparticules chargées contrairement au même procédé à pH=12 qui permettait d'aboutir à des microparticules chargées à 23%. Un taux d'encapsulation plus élevé peut également être obtenu en pré-saturant la phase aqueuse avec l'actif [Dubernet et al., 1987] ou bien avec des sels [Bodmeier et McGinity, 1987] afin de diminuer la solubilité de la matière active à encapsuler dans la phase aqueuse externe. Le Ray et al., 2003 ont par exemple utilisé la saturation du milieu aqueux externe avec du sel afin d'éviter la dissolution de la vancomycine dans la phase aqueuse durant le processus d'émulsification. Cette technique permet d'obtenir des taux d'encapsulation élevés de 91,81% contre 57,28% avec une phase aqueuse non saturée.

4.1.3 La nature du polymère

La nature du polymère utilisé impacte de manière significative l'efficacité d'encapsulation de par plusieurs raisons invoquées dans la littérature. En effet, Zhu et al., 2005 ont prouvé que le taux d'encapsulation de l'ibuprofène diminue avec l'utilisation d'une matrice enrobante concentrée en poly(ϵ -caprolactone). En effet, l'utilisation d'acide polylactique comme matrice polymérique permet d'obtenir une efficacité d'encapsulation de 81,21% qui diminue à 74,15% et 25,38% avec respectivement le copolymère acide polylactique-co-poly(ϵ -caprolactone) et le poly(ϵ -caprolactone) pur. Cette efficacité d'encapsulation peu élevée pour des matrices chargées en poly(ϵ -caprolactone) est expliquée par le fait qu'une certaine flexibilité est attribuée au poly(ϵ -caprolactone) par rapport à l'acide polylactique de par la faible température de transition vitreuse du poly(ϵ -caprolactone) autour de -60°C. Ceci résulte en un coefficient de diffusion important pour le principe actif au sein de la matrice de poly(ϵ -caprolactone) aboutissant à une perte de l'actif vers la phase aqueuse externe diminuant ainsi le taux d'encapsulation. En outre, LeCorre et al., 1994 ont également prouvé que l'encapsulation de bupivacaïne était jusqu'à deux fois moins importante en utilisant l'acide polylactique comparé à l'acide poly(lactique-co-glycolique) avec des taux d'encapsulation

variant de 20,7% à 49,6% en utilisant le même procédé. Cela a été attribué à un taux de précipitation plus rapide pour l'acide poly(lactique-co-glycolique) à l'interface de la gouttelette limitant la perte de l'actif au sein de la phase aqueuse [Bodmeier et McGinity, 1988]. En outre, Benoit et al., 1999 et Kim et al., 2005 ont supposé que l'encapsulation de principes actifs hydrophobes était favorisée dans les zones amorphes du polymère. Par conséquent un faible taux de cristallinité est favorable à un taux d'encapsulation plus important.

4.1.4 Le couple actif/polymère

L'affinité entre le principe actif et le polymère impacte l'efficacité d'encapsulation. Chung et al., 2001 ont prouvé qu'en utilisant un même actif, comme la lidocaïne par exemple, l'efficacité d'encapsulation pouvait être jusqu'à 2 fois moins importante avec le poly(DL-acide lactique) comparé au poly(L-acide lactique). En effet, la matrice de poly(L-acide lactique) est davantage hydrophobe et cristalline par rapport à celle de poly(DL-acide lactique) [Sah et al., 1994] ce qui lui confère une affinité plus importante avec le principe actif. Fernández-Carballido et al., 2004 ont quant à eux démontré que l'interaction entre la matière active qu'est l'ibuprofène et le polymère enrobant qu'est l'acide poly(lactique-co-glycolique) affecte l'efficacité d'encapsulation. Pour un polymère de masse molaire égale à 34.000g/mol l'efficacité d'encapsulation atteint 84,46% contrairement à 46,04% pour 80.000g/mol. En effet, lorsque la masse molaire diminue le nombre de fonctions terminales de type acide carboxylique augmente ce qui améliore l'affinité avec le principe actif en permettant la formation de liaisons hydrogènes avec le principe actif.

Dans tous les cas et quelque soit l'affinité du principe actif et du polymère concernés, il existe un taux maximal d'encapsulation donné pour un couple polymère/actif au-delà duquel le principe actif va se solubiliser dans la phase aqueuse ou former des cristaux [Sansdrap et Moës, 1993].

4.1.5 La masse et la masse molaire du polymère

➤ Influence sur la taille

La masse du polymère ainsi que sa masse molaire modifient la viscosité de la phase organique. En effet, l'équation de Huggins réduite au second ordre dans le régime dilué (eq. 4) et l'équation générale de Mark–Houwink–Sakurada (eq. 5) prouvent que la viscosité de la solution organique augmente avec la concentration et la masse molaire du polymère respectivement:

$$\frac{\eta}{\eta_s} = 1 + [\eta]c + k_h[\eta]^2c^2 \quad [\text{BI.4}]$$

avec :

- η viscosité de la solution (mPa.s)
- η_s viscosité du solvant pur (mPa.s)
- $[\eta]$ viscosité intrinsèque (mPa.s)
- C concentration en polymère (mol/L)
- k_h constante de Huggins (sans dimension)

$$[\eta] = K \times M_v^a \quad \text{[BI.5]}$$

avec :

$$M_v = \left(\frac{\sum_i N_i M_i^{1+a}}{\sum_i N_i M_i} \right)^{\frac{1}{a}} \quad \text{masse moléculaire moyenne viscosimétrique} \quad \text{[BI.6]}$$

K et a constantes caractéristiques d'un couple polymère/solvant

La viscosité de la phase dispersée peut donc être augmentée soit par une augmentation de la concentration du polymère soit par l'utilisation d'un polymère de masse moléculaire plus élevée [André-Abrant et al., 2001].

Une relation empirique décrit l'impact de la viscosité sur la taille de l'émulsion en utilisant l'équation de Kolmogorov :

$$\lambda = \left(\frac{\eta_c^3}{\varepsilon \rho_c^3} \right)^{\frac{1}{4}} \quad \text{[BI.7]}$$

avec :

- λ diamètre de la plus large gouttelette d'émulsion (m)
- η_c viscosité de la phase continue (mPa.s)
- ε énergie spécifique dissipée par la pale d'agitation (W/kg)
- ρ_c masse volumique de la phase continue (kg/m³)

Il a donc été prouvé théoriquement qu'une augmentation de la masse ou la masse molaire du polymère à volume de solvant fixé engendre une phase organique davantage visqueuse résultant en une augmentation de la taille des microparticules obtenues. Expérimentalement, Benoit et al., 1999 ont prouvé que les tailles des microparticules de poly(ε -

caprolactone) contenant de l'albumine de sérum bovin augmentent d'un facteur 2,7 lorsque la concentration en polymère passe de 0,5% à 6%. De même, Jeong et al., 2003 ont prouvé que la taille des microparticules de poly(ϵ -caprolactone) augmente de 21,3 μ m à 38,8 μ m en utilisant respectivement 2.7% et 7% de polymère au sein de la phase organique. Yang et al., 2000a ont également mesuré que la taille des microsphères d'éthylcellulose obtenues est 2,6 fois plus importante en utilisant 8% de polymère par rapport à 4%. En effet, une augmentation de la concentration en polymère engendre une phase organique davantage visqueuse [Rodriguez et al., 1998] qui sera donc plus résistante au cisaillement [Jeffery et al., 1991] résultant en une réduction de l'efficacité de rupture [Yang et al., 2001]. Une seconde hypothèse de la littérature indique qu'une phase organique plus concentrée en polymère augmente la fréquence de collisions. Ceci a pour conséquence la fusion des semi-particules résultant en des microparticules de tailles plus importantes [Benoit et al., 1999 ; Jeffery et al., 1991].

➤ Influence sur l'efficacité d'encapsulation

Une modification de la masse et/ou de la masse molaire du polymère a également un impact sur l'efficacité d'encapsulation. En effet, l'augmentation de la viscosité de la phase organique par une élévation de la masse ou de la masse molaire du polymère utilisé restreint la migration du principe actif au sein de la phase aqueuse externe [Rafati et al., 1997, Jeong et al., 2003] ce qui résulte en un taux d'encapsulation plus élevé [Yang et al., 2000a]. Kim et al., 2005 ont ainsi démontré que le taux d'encapsulation de la felodipine dans des microparticules de poly(ϵ -caprolactone) passe de 73,5% à 87,6% lorsque la masse molaire du polymère enrobant varie de 10.000g.mol⁻¹ à 80.000g.mol⁻¹. Benoit et al, 1999 ont également prouvé que le taux d'encapsulation de l'albumine de sérum bovin augmente d'un facteur 2 lorsque la concentration en polymère passe de 0,5% à 6%.

4.1.6 Le rapport actif/polymère

Des études ont montré qu'une augmentation du rapport actif/polymère est favorable à un taux encapsulation plus élevé jusqu'à un certain seuil [Thompson et al., 2007 ; Kilicarslan et Baykana, 2003]. Jeffery et al., 1993 ont en effet démontré que l'encapsulation de l'ovalbumine dans l'acide poly(lactique-co-glycolique) est favorisée pour un rapport actif/polymère égale à 1/2 comparé à 1/10 avec un taux d'encapsulation 1,6 fois plus important. Par contre avec un rapport actif/polymère de 1/1 le taux d'encapsulation diminue. Dhanaraju et al., 2010 ont également prouvé que le taux d'encapsulation de l'étoposide dans le poly(ϵ -caprolactone) était plus important d'un facteur 1,5 pour un rapport actif/polymère de 1/10 par rapport à 1/5. De ce fait, il a été démontré que la quantité d'actif qu'il est possible d'encapsuler au sein d'une microparticule est limitée. Ceci peut être expliqué par le fait que la quantité de polymère est insuffisante pour couvrir entièrement tout le principe actif qui se retrouve en surface et qui peut donc se dissoudre ou se disperser au sein de la phase aqueuse externe, en laissant parfois un état de surface troué [Jeffery et al., 1993 ; Dhanaraju et al., 2010, Benoit et

al., 1999 ; Kim et al., 2005 ; Jeong et al., 2003]. De plus, une quantité en actif trop importante augmente les risques de perte à cause de l'espace limité disponible à l'intérieur des microsphères notamment après le rétrécissement résultant de l'évaporation du solvant [Li et al., 2008].

4.1.7 L'agent stabilisant

L'agent stabilisant est utilisé pour stabiliser l'interface de l'émulsion directe réalisée lors du mélange de la phase organique au sein de la phase aqueuse sous agitation. Il existe plusieurs types d'agents stabilisants :

- les agents tensioactifs
- les polymères comme les protéines, les gommes ou les amidons
- les fines particules insolubles dans la phase continue

Les agents stabilisants permettent de stabiliser l'émulsion en réduisant la tension interfaciale entre la phase continue et la phase dispersée. Ils évitent également la coalescence et l'agglomération des gouttelettes d'émulsion qui affectent leurs tailles durant les premiers instants de l'évaporation de solvant [Dhanaraju et al., 2010, Grandfils et al., 1992]. En prenant l'exemple du solvant le plus utilisé en microencapsulation par évaporation de solvant à savoir le dichlorométhane, la stabilisation de la dispersion est assurée par le tensioactif polysorbate 80 en général. Néanmoins, il est plus communément utilisé des polymères stabilisants tels que l'alcool polyvinylique partiellement hydrolysé et la méthylcellulose [Benoit et al., 1999 ; Kim et al., 2005 ; Li et al., 2008 ; Berchane et al., 2006]. Une manipulation préliminaire testant plusieurs tensioactifs ou polymères stabilisants peut être réalisée afin de permettre la détermination de la molécule permettant l'abaissement de la tension interfaciale le plus important [Jeffery et al., 1991]. En effet, Kim et al., 2005 ont démontré que, à même procédé, l'utilisation d'alcool polyvinylique permet une stabilisation maximale de l'émulsion avec une taille moyenne résultante de 5,53 μ m contrairement à la gélatine qui permet d'obtenir des particules de 9,09 μ m. Jalil et Nixon, 1990a ont également prouvé que, à même procédé utilisant de l'huile de paraffine en phase externe, l'utilisation du span 40 à 1% par rapport au span 65 sur des microparticules d'acide polylactique permettait de réduire les diamètres moyens de 667 μ m à 305 μ m.

➤ Influence sur la taille

Il a été observé qu'une augmentation de la concentration en agent stabilisant permet une diminution des tailles de par une stabilisation de l'interface plus efficace. Ce phénomène est vérifié jusqu'à une certaine concentration limite à partir de laquelle les tailles de gouttelettes ne

sont plus modifiées. Ceci est en accord avec la théorie. En effet, dans le cas de l'utilisation de tensioactifs, l'adsorption à l'interface est réalisée proportionnellement à la concentration ce qui diminue la tension superficielle. Lorsque la concentration micellaire critique est atteinte les surfaces des gouttelettes de phase dispersée sont saturées. L'ajout de tensioactif supplémentaire conduit donc à la formation de micelles en solution, qui influencent peu la tension superficielle. Bien que dans les manipulations de microencapsulation par évaporation de solvant il est très souvent utilisé des polymères stabilisants qui n'ont pas tout à fait le même comportement théorique que les tensioactifs, la même tendance a été observée. En effet, Sansdrap et Moës, 1993 ont démontré qu'une augmentation de la concentration en polymère stabilisant qu'est l'hydroxypropyl méthylcellulose de 0,4% à 2,4% permet une diminution de la distribution des tailles de particules obtenues de 28,5µm à 12,9µm respectivement. Dhanaraju et al., 2010 ; Zhu et al., 2005 ainsi que Jeffery et al., 1991 ont démontré le même effet pour plusieurs polymères stabilisants dont l'alcool polyvinylique et la méthylcellulose. Jalil et Nixon, 1990a ont également prouvé que la taille des particules diminue avec la concentration en tensioactifs que sont les span 40 et 65 grâce à une répartition à l'interface des gouttelettes plus homogène permettant une meilleure protection contre la coalescence. Cependant, à des concentrations en span 40 et 65 supérieures à 2%, la taille des gouttelettes obtenues varie faiblement. Il en a été conclu que, à cette concentration, la répartition des agents de surface à l'interface est optimale et que l'adsorption de nouvelles molécules n'est plus possible. Concernant l'alcool polyvinylique, les travaux de Grandfils et al., 1992 ont démontré que la taille des particules obtenues avec le poly(DL-acide lactique) diminue effectivement lorsque la concentration en polymère stabilisant augmente mais ce jusqu'à une certaine limite. Passé 0,75% la taille des particules ne décroît plus et même tend à augmenter pour 3% en alcool polyvinylique. Il est probable qu'une concentration trop importante en polymère stabilisant dans le milieu augmente les probabilités d'interaction et donc de coalescence. Maia et al., 2004 ont également prouvé que les tailles de particules réalisées avec du polyhydroxybutyrate-co-valérate diminuent de 389,2µm à 38,6µm pour une concentration en alcool polyvinylique croissante de 0,5% à 2%. Il n'est par contre pas observé de diminution significative de la taille moyenne des particules obtenues avec 4% en polymère stabilisant. De plus, en permettant d'éviter la coalescence ou l'aggrégation, l'utilisation d'agents stabilisants appropriés résulte en l'obtention de particules homogènes en tailles [Lin et Huang, 2001, Crotts et Park, 1995].

➤ Influence sur le taux d'encapsulation

La présence de tensioactifs ou de polymères stabilisants impacte le taux d'encapsulation en principe actif. Plusieurs auteurs ont notamment démontré qu'une augmentation de la concentration en alcool polyvinylique permet d'obtenir un taux d'encapsulation plus important [Dhanaraju et al., 2010]. En effet, Conti et al., 1995 ont mesuré que lorsque des faibles quantités d'alcool polyvinylique sont utilisées (0,5%), le taux d'encapsulation d'indométhacine au sein de particules d'acide poly(lactide-co-glycolique) est hautement dépendant de la vitesse d'agitation lors de l'émulsification avec des taux d'encapsulation de 17,5% et 90% pour des

vitesse de 8.000rpm et 20.500rpm respectivement. Au contraire, une influence minimale de la vitesse d'agitation sur le taux d'encapsulation a été relevée pour une concentration de 2% en alcool polyvinylique. Zhu et al., 2005 ont également prouvé que le taux d'encapsulation de l'ibuprofène au sein de microparticules d'acide polylactique diminue de 88,25% à 67,6% lorsque la concentration en alcool polyvinylique passe de 0,5 à 0,1%. L'hypothèse avancée est que, comme l'alcool polyvinylique utilisé pour les expériences est un polymère avec une masse molaire importante, l'augmentation de sa concentration mène à une augmentation de la viscosité de la phase aqueuse externe ce qui permet de former un film protecteur à la surface des gouttelettes. Durant le processus de solidification des microsphères la formation d'une telle couche empêche la diffusion de l'ibuprofène de la phase organique vers la phase aqueuse externe. Des résultats contradictoires ont été trouvés par Benoit et al., 1999 qui ont mesuré une diminution d'un facteur 1,7 du taux d'encapsulation de l'albumine de sérum bovin au sein de microparticules de poly(ϵ -caprolactone) liée à l'utilisation de 10% d'alcool polyvinylique contre 0,5% au sein de la phase aqueuse externe. Cela pourrait être corrélé à l'augmentation de taille des microparticules obtenues avec 10% d'alcool poly(vinyle) ce qui augmente la surface de contact entre la phase dispersée et la phase aqueuse favorisant ainsi la diffusion de du principe actif au sein de la phase externe.

4.1.8 Rapport de la fraction de phase organique/aqueuse

➤ Influence sur la taille

La littérature propose différentes théories quant à l'influence du rapport volumique de phase organique par rapport à la phase aqueuse externe sur la taille des microparticules. En effet, Sansdrap et Moës, 1993 ont prouvé qu'il n'y a aucune influence sur la taille des particules formées pour un rapport de la fraction de phase dispersée/phase aqueuse de 1/5 à 1/25. D'autres travaux montrent que, tout autre paramètre restant constant, une diminution du volume de la phase aqueuse par rapport à celui de la phase organique résulte en une diminution des tailles de particules obtenues [André-Abrant et al., 2001]. En effet, il a été démontré qu'une augmentation du rapport de la fraction de phase organique par rapport à la phase aqueuse externe de 1/100 à 1/10 a pour conséquence une diminution de la taille des particules de 75 μ m à 40 μ m [Jeyanti et al., 1997]. Les mesures de Jeffery et al., 1991 pour des rapports de 1/60 à 1/30 aboutissent à la même conclusion avec une réduction de 40% du diamètre moyen des particules passant de 14,76 μ m à 8,36 μ m. En effet, en diminuant la quantité de phase aqueuse et donc de volume du système à mêmes autres paramètres constants, l'efficacité du cisaillement sera plus importante ce qui permettra d'obtenir une fracture optimale des gouttelettes d'émulsion.

➤ Influence sur la répartition en actif et sur la concentration résiduelle en solvant

Il a été prouvé que la solidification des gouttelettes d'émulsion est rapide pour des expériences avec des émulsions diluées. Par exemple, Li et al., 1995a ont prouvé que pour les rapports de fraction de phase organique/phase aqueuse égales à 1/100 et 1/200, le solvant contenu dans les gouttelettes de phase organique diminue rapidement jusqu'à atteindre 10% de sa concentration initiale en 40 secondes. Une explication repose sur le transfert de masse de solvant rapide provoqué par des conditions sink plus favorables de par un volume en phase aqueuse externe plus important. Une évaporation rapide à l'interface résulte en une solution polymérique visqueuse ce qui ralentit les transferts de masse dans cette région puisque les chaînes de polymère sont proches les unes des autres [Crotts et Park, 1995]. De ce fait, cela limite le mouvement de l'actif vers le milieu extérieur mais également celui du solvant. Ainsi un séchage rapide va provoquer une distribution homogène en actif au sein des microparticules qui ne sera pas en contact prolongé avec la phase aqueuse externe. Cela a également pour conséquence l'obtention d'une concentration résiduelle en solvant au sein des microparticules plus importante jusqu'à 76 fois en diminuant par 10 le rapport entre les fractions de phase organique/aqueuse.

Le tableau BI.4 résume l'impact des conditions de formulation sur les propriétés des microsphères.

Tableau BI.4. Influence des paramètres de formulation sur les propriétés des microsphères (adapté à partir de Li et al., 2008).

	Facteur	Taille moyenne	Taux d'encapsulation	Morphologie de surface	Références
Paramètres de formulation	augmentation du rapport actif/polymère	augmentation	augmentation puis diminution à partir de 1/1	constellée de trous	Jeffery et al., 1993
			diminution à partir de 1/5	sphérique et relativement lisse	Dhanaraju et al., 2010
	augmentation du caractère hydrophile de l'actif	/	diminution	lisse avec quelques trous	Perez et al., 2000
	augmentation de la viscosité de la phase organique	augmentation	augmentation	lisse, particules sous forme individuelles ou aggrégées	Rodriguez et al., 1998; Jeffery et al., 1991; Benoit et al., 1999; Rafati et al., 1997; Kim et al., 2005
	augmentation de la concentration en tensioactif	diminution	diminution	/	Jeffery et al., 1993; Dhanaraju et al., 2010; Sansdrap et Moës, 1993; Zhu et al., 2005; Conti et al., 1995
	augmentation du rapport de la fraction de phase dispersée/phase aqueuse	diminution	/	/	Jeyanti et al., 1997; Jeffery et al., 1991; André-Abrant et al., 2001
	diminution de la solubilité du solvant au sein de la phase aqueuse externe	/	diminution	sphérique	Bodmeir et McGinity, 1988
	diminution du volume de solvant au sein de la phase organique	augmentation	/	/	Sansdrap et Moës, 1993; André-Abrant et al., 2001

4.2 Impact des paramètres du procédé sur les caractéristiques des microparticules

4.2.1 Influence de la vitesse d'agitation et du cisaillement

➤ Influence sur la taille

L'agitation est un paramètre important pour contrôler la taille des microsphères. La corrélation la plus employée pour décrire l'évolution de la taille des particules en fonction de l'agitation est basée sur la théorie de Kolmogoroff [Hinze, 1955]:

$$\frac{d_{max}}{D} = c_1 \left(\frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma} \right)^{-3/5} \quad [\text{BI.8}]$$

avec :

d_{max} taille de goutte la plus importante qui peut exister sous les turbulences (m)

D diamètre de la pale d'agitation (m)

ρ_c densité de la phase continue (kg/m³)

N vitesse d'agitation (tour/sec)

σ tension interfaciale entre les phases continue et dispersée (N/m)

c_1 constante liée aux conditions d'agitation

La variation de la vitesse d'agitation de l'émulsion permet de modifier la taille des microparticules [Grandfils et al., 1992]. Il a été prouvé, en accord avec la théorie, que les tailles des particules diminuent lorsque la vitesse d'agitation augmente [Zhu et al., 2005, Zhang et al., 2005 ; Mateovic et al., 2002 ; Yang et al., 2001, Gabor et al., 1999]. En effet, dans ce cas l'énergie fournie au système lors de l'émulsification est plus importante ce qui permet une fracture optimale et maximale de la phase organique en petite gouttelettes dispersées [Sansdrap et Moës, 1993]. La force de cisaillement liée au système d'agitation est aussi un paramètre important affectant la taille des particules. En effet, Dubernet et al., 1987 ont mesuré que les tailles de particules passaient de 630µm avec une pale d'agitation à 3700rpm à 30µm obtenues avec l'utilisation d'un rotor stator à 1500rpm.

➤ Influence sur le taux d'encapsulation

La littérature démontre qu'une augmentation de la vitesse d'agitation a pour conséquence une diminution du taux d'encapsulation du principe actif considéré. LeCorre et al., 1994 ont par exemple prouvé que la vitesse d'agitation durant la phase d'émulsification utilisant de l'acide polylactique et de la bupivacaïne influençait largement la teneur finale en principe actif avec 21,7, 19,9 et 19% pour 2.000, 3.000 et 4.000 rpm respectivement. En effet, lorsque la taille des particules diminue la surface de contact entre la phase organique et la phase aqueuse augmente et le transfert du principe actif vers la phase externe est favorisé [André-Abrant et al., 2001].

4.2.2 Impact des conditions d'évaporation

L'évaporation du solvant peut être réalisée à pression ambiante ou réduite. Le procédé choisi influencera différemment les propriétés des microparticules résultantes en modifiant les configurations des matrices polymériques enrobantes ainsi que des matières actives.

➤ Influence sur la durée du procédé

Une évaporation à pression réduite permet de réduire la durée nécessaire afin d'obtenir l'évaporation du solvant des gouttelettes d'émulsion. En effet, Chung et al., 2001 ; Yang et al., 2000a ; Izumikawa et al., 1991 obtiennent un temps d'évaporation qui dure entre 2 et 3h à pression réduite à 160mmHg, 500mmHg et 200mmHg respectivement contre plus de six heures à pression atmosphérique.

➤ Influence sur la taille

Des travaux montrent qu'une évaporation à pression réduite permet d'aboutir à des microparticules de plus petites tailles [Izumikawa et al., 1991 ; Chung et al., 2001]. Ceci peut être expliqué par l'équation de Laplace qui est exprimée suivant l'équation BI.9 [Atkins, 1998],

$$dP = 2g/r \quad \text{[BI.9]}$$

avec :

dP différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur du film liquide de la gouttelette d'émulsion (Pa)

g tension interfaciale du liquide de l'émulsion (N/m)

r rayon de la gouttelette sphérique (m)

La valeur de g peut être considérée comme constante durant le processus d'évaporation [Chung et al., 2001]. La valeur de dP est plus importante dans le cas d'une évaporation forcée. Par conséquent, le rayon moyen des microsphères obtenu dans des conditions de pression réduite est inférieur à celui obtenu pour des conditions ambiantes.

➤ Influence sur la cristallinité et la morphologie

Si l'actif se trouve totalement dissout dans la phase organique lors de l'émulsification il peut précipiter dans les microsphères durant la précipitation du polymère sous une forme cristalline ou amorphe. Il a été prouvé que lors d'une évaporation à pression atmosphérique à 760mmHg durant 6h pour Chung et al., 2001 et 18h pour Izumikawa et al., 1991, les microparticules de poly(DL-acide lactique) résultantes sont composées d'un polymère ainsi que d'un principe actif qui sont davantage cristallins comparé aux conditions d'évaporation à pression réduite pour lesquelles les matrices sont amorphes. Ceci est expliqué par le fait que l'élimination du solvant est trop rapide avec des conditions de pression réduite pour permettre aux chaînes de s'ordonner et donc à la matière de cristalliser [Sastre et al., 2004]. De plus, la cristallinité des microsphères a une influence directe sur la morphologie. En effet, une évaporation sous pression atmosphérique permet d'aboutir à des microparticules dont les états de surface sont rugueux. A l'inverse, celles préparées avec une évaporation sous pression réduite sont lisses [Izumikawa et al., 1991 ; Chung et al., 2001].

➤ Influence sur le rendement d'encapsulation

Les conclusions concernant les différences de taux d'encapsulation pour des conditions d'évaporation sous pression normale et réduite sont controversées. En effet, d'une part Chung et al., 2001 ont prouvé qu'avec des conditions ambiantes d'évaporation un taux d'encapsulation plus important de la lidocaïne dans le poly(L-acide lactique) est obtenu. Ceci est expliqué par le fait que grâce à une évaporation à pression atmosphérique, le polymère a une structure cristalline plus importante par rapport aux manipulations réalisées à pression réduite ce qui permettra une affinité supérieure avec le principe actif cristallin qu'est la lidocaïne. D'autres travaux contradictoires avec ceux de Chung et al., 2001 montrent que la teneur en actif qu'est la progestérone au sein des microparticules de poly(L-acide lactique) est plus importante dans le cas de procédés à pression réduite puisque la durée du processus d'évaporation est de 3h contre 18h pour une évaporation à pression ambiante, ce qui limite les pertes [Izumikawa et al., 1991]. De plus, pour des conditions d'évaporation à pression normale l'état de surface de la particule réalisée est rugueux et poreux ce qui augmente la surface de contact avec le milieu aqueux externe et donc peut engendrer des pertes de principe actif.

Le tableau B.I.5 résume l'impact des paramètres du procédé sur les propriétés des microsphères.

Tableau B.I.5. Influence des paramètres du procédé sur les propriétés des microsphères (adapté à partir de Li et al., 2008).

	Facteur	Taille moyenne	Taux d'encapsulation	Morphologie de surface	Références
Paramètres du procédé	augmentation de la vitesse d'agitation	diminution	diminution	/	Grandfils et al., 1992; Zhu et al., 2005, Zhang et al., 2005, Sansdrap et Moës, 1993, André-Abrant et al., 2001; Mateovic et al., 2002; LeCorre et al., 1994
	diminution de la pression d'évaporation	diminution	diminution ou augmentation selon les auteurs	rugueuse, poreuse	Izumikawa et al., 1991; Chung et al., 2001

4.3 Etude de la cinétique d'évaporation

Lors de l'évaporation du solvant deux flux de masses interviennent:

- 1) le solvant diffuse depuis les gouttelettes de phase dispersée vers la phase aqueuse
- 2) le solvant diffuse dans la phase continue et s'évapore à l'interface eau/air

Lors de l'évaporation du solvant, les gouttelettes de phase dispersée deviennent riches en polymère et elles commencent à se solidifier. Le processus d'évaporation du solvant peut être divisé en trois étapes. La première étape correspond à la saturation de la phase aqueuse par le solvant de la phase organique et elle est généralement négligée car elle ne dure que quelques secondes [Li et al., 1995a et b, Li et al., 2008]. Lors de la deuxième étape, la quantité de solvant évaporé à l'interface eau/air est compensée par celle qui diffuse de la phase organique vers la phase aqueuse [Li et al., 2008]. Lors de cette étape, la quantité de solvant évaporé en fonction du temps est linéaire et peut être décrite par la loi de Fick :

$$\frac{dM}{dt} = -AKC_{sol} \quad \text{[BI.10]}$$

avec :

- M masse totale de solvant (kg)
- A surface de contact de l'interface eau/air (m²)
- t temps (s)
- K constante d'évaporation (m/s)

C_{sol} solubilité du solvant dans la phase continue (kg/m³)

La troisième étape prend place à un temps critique t_c et est caractérisée par une concentration en solvant au sein de la phase aqueuse inférieure à la limite de solubilité du solvant car les gouttelettes de phase organique deviennent riches en polymère, notamment à la périphérie, et donc la diffusivité du solvant au sein de la phase dispersée diminue. La masse de solvant évaporé peut alors être approximée par :

$$dM = V \cdot dC_s \quad [\text{BI.11}]$$

avec :

dC_s variation infinitésimale de solvant dans la phase continue (kg/m³)

V volume de la phase continue (m³)

La concentration du solvant au sein de la phase aqueuse poursuit alors une décroissance exponentielle. En combinant les équations 11 et 12 il est obtenu :

$$C_s = C_{sol} e^{-\left(\frac{A}{V}\right)K(t-t_c)} \quad [\text{BI.12}]$$

De plus, en suivant la théorie des films pour un transfert de masse entre deux phases [Backhurst et al., 1974] il est également obtenu que :

$$K = \frac{D_c}{\delta} \quad [\text{BI.13}]$$

avec :

D_c diffusivité du solvant organique au sein de la phase continue (m²/s)

δ épaisseur de la couche limite de diffusion du côté de la phase aqueuse (m) dépendant des conditions opératoires telles que la géométrie de la pale d'agitation, le volume de la phase continue, la vitesse d'agitation et la viscosité cinématique de la phase continue. Les travaux de Li et al., 2008 reportent que l'estimation de la valeur de K est incertaine car trop peu de travaux concernant son étude sont disponibles.

Ce modèle n'est valable uniquement lorsque le transfert de masse entre la phase organique et aqueuse est plus important que celui entre l'interface eau/air. D'autres modèles ont été développés, et notamment celui de Li et al., 1995a et b qui permet de prédire les profils

de concentration dans les phases organiques et aqueuses ainsi que l'évolution des tailles des gouttelettes et la quantité de solvant résiduel au sein des microparticules. Le modèle a été testé par Li et al., 1995b en utilisant des microsphères d'acide poly(lactique-co-glycolique) et les résultats montrent une bonne corrélation entre les données expérimentales et théoriques.

4.4 Etude de la cinétique de libération pour des microsphères polymériques

4.4.1 Les différents types de libération

Les microsphères polymériques peuvent être utilisées afin de libérer le principe actif avec un taux contrôlé et/ou un ciblage. Les facteurs qui affectent la libération du principe actif sont la structure de la matrice dans laquelle l'actif est contenu et les propriétés physico-chimiques associées au polymère et au principe actif. Si les interactions matière active/milieu extérieur sont considérées, il existe deux types de microparticules :

- celles qui ne doivent pas libérer leur contenu telles que les microréacteurs contenant des enzymes ou des bactéries (cf *Etude bibliographique – Partie 1 – section 1.2 Objectifs de l'encapsulation et domaines d'applications – Immobiliser ou isoler* ; Matsuura et al., 2011).
- celles qui libèrent leur principe actif [Berkland et al., 2002].

Pour les microparticules qui libèrent leur contenu, il faut faire la distinction entre deux systèmes :

- les *systèmes à libération déclenchée* qui sont généralement des microcapsules formées par une membrane ayant une faible perméabilité qui vont libérer brutalement leur contenu par fracturation sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique), d'un cisaillement ou par exemple par fusion due à une variation de la température [Bartkowiak et Hunkeler, 1999].
- les *systèmes à libération prolongée* dans lesquels le principe actif peut être libéré par diffusion passive à travers la membrane polymérique ou par dégradation/dissolution progressive du matériau enrobant

La libération dépendra donc de la structure des systèmes étudiés (microcapsules ou microsphères) [Smith et Herbig, 1992].

4.4.2 Profils de libération pour des microsphères polymériques non dégradables

A partir de microsphères polymériques, qui sont des systèmes matriciels, deux mécanismes de libération sont disponibles : la libération par la dégradation de la matrice polymérique et/ou la libération par diffusion de l'actif au travers de la membrane polymérique.

En considérant un processus purement diffusionnel de la molécule active à travers la matrice polymérique, la libération sera décrite par une cinétique obéissant à la loi d'Higuchi [Dash et al., 2010]:

$$Q = K_H t^{0.5} \quad \text{[BI.14]}$$

avec:

Q fraction de principe actif libéré dans le temps (%)

K_H constante de dissolution d'Higuchi (%/s^{-0.5})

t temps (s)

Cette loi montre que la quantité libérée de matière active est directement proportionnelle à la racine carrée du temps.

Le profil de libération le plus souhaité serait d'avoir une libération constante en fonction du temps. Cependant, très généralement, les profils de libération sont plus compliqués et contiennent deux comportements. Initialement l'actif des couches superficielles de la microsphère est libéré. Ceci engendre une première étape rapide appelée effet « burst » [LeCorre et al., 1994, Okada et al., 1994 ; Ghaderi et al., 1996 ; Dordunoo et al., 1995 ; Yan et al., 1994 ; Jameela et al., 1997 ; Izumikawa et al., 1991]. Il s'en suit une libération davantage modérée dépendant de la diffusion de l'actif situé dans les régions internes au travers de la matrice polymérique et/ou de la dégradation du polymère [Dhanaraju et al., 2010 ; Shinha et Trehan, 2005 ; Perez et al., 2000 ; Dhanaraju et al., 2003 ; Yang et al., 2001]. Certains chercheurs ont été capables d'obtenir des cinétiques ajustables en fonction de l'application finale désirée. Par exemple, une cinétique avec deux étapes rapides a été découverte par Makino et al., 2000. En effet, il a prouvé que la libération d'estradiol au sein de microparticules d'acide poly(lactique-co-glycolique) augmente les 30 premiers jours jusqu'à 30%. A 40 jours, la quantité libérée augmente de nouveau et atteint 100% en 60 jours.

4.4.3 Influence de la taille des microparticules

La cinétique de libération est inversement proportionnelle à la taille des particules [Roy et al., 1992]. Sansdrap et Moës, 1997 ont par exemple prouvé que les microsphères d'acide poly(lactique-co-glycolique) avec des tailles moyennes de 12 μ m démontrent une libération complète de la nifédipine en 14 jours comparé aux microsphères de 80 μ m qui nécessitent 17 jours. En effet, la libération de la matière active diminue lorsque la taille augmente et ce pour deux raisons. D'une part la surface de contact avec le milieu extérieur diminue et d'autre part la distance à parcourir pour atteindre le milieu de libération extérieur est plus importante [Yang et al., 2001 ; Zhang et al., 2005]. Dans le cas de particules de petites tailles, la surface de contact est donc plus importante et l'actif est rapidement en contact avec le milieu de libération [Sansdrap et Moës, 1993, Dhanaraju et al., 2010 ; Jeong et al., 2003 ; Dubernet et al., 1987]. Par conséquent, il est possible d'obtenir des cinétiques de libération maîtrisées en utilisant diverses tailles de microsphères. Par exemple, Narayani et Rao, 1996 ont utilisé des microsphères de gélatine avec des tailles comprises entre 1 et 35 μ m résultant en une cinétique de libération du 5-fluorouracile d'ordre zéro. Berkland et al., 2002 ont également réussi à obtenir une cinétique de libération d'ordre zéro en mélangeant des microsphères de tailles uniformes.

4.4.4 Influence de la nature de la matrice enrobante

Les propriétés physico-chimiques du polymère enrobant influencent la cinétique de libération du principe actif. Par conséquent si un polymère ne permet pas d'obtenir une cinétique de libération suffisante il est possible d'utiliser un co-polymère ou bien de modifier la nature de la matrice enrobante.

➤ Propriétés de dégradation

La nature de la matrice enrobante impacte de manière considérable la cinétique de libération pour des systèmes dégradables. Edlund et Albertsson, 2000 ont utilisé des mélanges d'acide polylactique et de poly(1,5-dioxepan-2-one) afin d'encapsuler de l'amitriptyline. Les résultats démontrent qu'une augmentation de la quantité en poly(1,5-dioxepan-2-one) accélère la cinétique de libération avec une libération pratiquement complète en 70 jours pour des microparticules constituées de 60% de poly(1,5-dioxepan-2-one) contre seulement 30% libérés pour 10% de poly(1,5-dioxepan-2-one). Cela est expliqué par l'augmentation du taux de dégradation de la matrice polymérique enrobante dû à un taux de cristallinité moins important pour le poly(1,5-dioxepan-2-one). De la même façon, les travaux de Suave et al., 2010 ont également montré que la libération de malathion depuis des microsphères de poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ϵ -caprolactone) est plus rapide pour des matrices ayant des compositions élevées en poly(3-hydroxybutyrate) et poly(ϵ -caprolactone). En effet, il a été

mesuré que les mélanges à 70/30 en poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ϵ -caprolactone) relarguaient plus rapidement que les matrices constituées de 90/10 ; 95/5 et 97/3. Ceci a été attribué à la dégradation plus importante du mélange à 70/30 dû à l'immiscibilité des polymères à ces concentrations. Mi et al., 2002 ont quant à eux modulé la cinétique de libération du chlorambucil avec un mélange enrobant constitué d'acide poly(lactique-co-glycolique) et de chitine. En effet, la dégradation de la chitine est rapide grâce à ses propriétés hydrophiles comparé à l'acide poly(lactique-co-glycolique) qui est hydrophobe. De ce fait, la libération initiale rapide est attribuée à la dégradation de la chitine qui est ensuite suivie par un relargage plus lent attribué à la dégradation des sections d'acide poly(lactique-co-glycolique).

➤ Propriétés cristallines

La cinétique de libération est grandement influencée par la structure cristalline du polymère enrobant avec une libération plus rapide obtenue pour des matrices moins cristallines [Miyajima et al., 1997 ; Jeong et al., 2003 ; Zhu et al., 2005, Izumikawa et al., 1991 ; Edlund and Albertsson, 2000]. En effet, la libération est favorisée au sein des matrices amorphes qui se dégradent plus facilement [Suave et al., 2010, Perez et al., 2000, Jeong et al., 2003], les matrices cristallines étant essentiellement imperméables à l'eau [Kim et al., 2005]. En suivant ce principe, Huang et al., 1997 ont prouvé que la libération d'actif au sein des copolymères d'acide polylactique/polyéthylène glycol était favorisée pour une composition en polyéthylène glycol de 9% comparée à 3%. Ceci est expliqué par le fait que le taux de cristallinité des copolymères diminue lorsque la quantité en polyéthylène glycol augmente ce qui favorise la libération. Des résultats contradictoires ont été obtenus par Izumikawa et al., 1991 qui ont démontré que des microparticules davantage amorphes libèrent le principe actif moins rapidement que les microparticules cristallines. Cela a été expliqué par le fait la baisse de cristallinité des microparticules favorise les interactions entre l'actif hydrophobe qu'est la progestérone avec la matrice polymérique d'acide polylactique.

➤ Masse molaire

En fonction des propriétés initiales du polymère enrobant, la masse molaire impacte notamment la cristallinité ainsi que la dégradabilité. Ces différents paramètres ont chacun une influence sur la cinétique de libération du principe actif.

Dans un premier temps, il a été prouvé que la cinétique de libération augmente lorsque la masse molaire du polymère utilisé au sein de la phase organique diminue. En effet, des faibles masses molaires résultent en des microsphères de tailles plus petites qui ont donc une surface de contact plus importante ainsi qu'une distance diffusionnelle moins importante pour la diffusion de l'actif vers le milieu de libération externe [Yang et al., 2001]. Les résultats de Jeong et al., 2003 démontrent quant à eux que lorsque la masse moléculaire du poly(ϵ -caprolactone) augmente de 10.000g.mol⁻¹ à 80.000g.mol⁻¹ la cinétique de libération est plus rapide. Cependant

les tailles des microparticules augmentent de 25,5µm à 40,8µm. Le comportement inverse aurait donc dû être observé si la cinétique de libération était uniquement influencée par la taille des particules. Il a néanmoins été mesuré que lorsque la masse molaire augmente, la cristallinité est considérablement réduite, par conséquent les zones amorphes seront plus nombreuses permettant une diffusion rapide du principe actif.

Pour les polymères dégradables, la dégradation montre que la libération du principe actif est dépendante de la masse molaire du polymère. Dans une étude de Jalil et al., 1990a, il a été prouvé que les sphères de polymère de faible masse molaire se dégradent rapidement contrairement aux sphères formées par un polymère de haute masse molaire où la quantité de produits dégradés et la masse molaire totale restent constantes pour des périodes de temps plus importantes. De ce fait les polymères de faibles masses molaires connaîtront une cinétique de libération plus rapide.

4.4.5 Influence des propriétés du principe actif

La structure chimique du principe actif conditionne sa libération. En effet, si la matière à encapsuler est très hydrophobe le partage ne sera pas en faveur du milieu aqueux de libération et les conditions sink seront difficiles à établir. Les travaux de Perez et al., 2000 démontrent que la haute solubilité dans l'eau du chlorhydrate de propranolol égale à 100mg/mL est en faveur de sa migration rapide vers le milieu externe contrairement à la nifédipine qui n'est soluble qu'à 11µg/mL. De même, plus le taux de cristallisation du principe actif est important et plus la libération sera lente [Zhu et al., 2005].

4.4.6 Influence de l'affinité actif/polymère

L'affinité entre le principe actif et le polymère enrobant est un paramètre conditionnant la libération [Sanders et al., 1985]. Suave et al., 2010 ont notamment observé que des mélanges à basses concentrations en poly(ε-caprolactone) tels que les mélanges poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ε-caprolactone) à 90/10, 95/5, et 97/3 libèrent moins rapidement le principe actif que les microsphères constituées de 100% de poly(ε-caprolactone). Il a été supposé qu'il existe une affinité plus importante entre la matrice enrobante et le principe actif pour des compositions contenant une fraction importante en poly(3-hydroxybutyrate) freinant ainsi la libération de l'actif.

4.4.7 Influence de la teneur en principe actif

Pour des particules de tailles similaires, la libération sera plus rapide pour des taux d'encapsulation plus importants [André-Abrant, 2001, Bodmeier et McGinity, 1987, Izumikawa et al., 1991 ; Huang et al., 1997]. Par exemple, Dordunoo et al., 1995 ont démontré

que pour les microsphères de poly(ϵ -caprolactone) contenant 1% et 2% de taxol, le pourcentage d'actif libéré est approximativement 3% et 6% respectivement après 21 jours. A 5% de taux de charge, la libération atteint 20% en 21 jours. Yang et al., 2001 ont également mesuré que la libération d'albumine de sérum bovin est plus rapide pour des taux de charge de 2,6% comparé à 0,66% et 0,45%. Ce résultat est expliqué par la mise en place d'un gradient de concentration important entre la particule chargée et le milieu extérieur. Comme le gradient est la force motrice pour la diffusion du principe actif il sera observé une libération plus rapide lorsque les particules contiennent une quantité importante de principe actif. De plus, à des forts taux de charges, l'actif diffuse dans le milieu extérieur en laissant des pores vides ou des réseaux interconnectés. Ceci facilite le relargage de l'actif restant ainsi que la pénétration du milieu externe accélérant ainsi la dissolution du principe actif [Yang et al., 2001, Bodmeier et McGinity, 1987, Dordunoo et al., 1995]. En outre, une augmentation de la teneur en principe actif va diminuer la cristallinité des polymères semi-cristallins résultant donc en une libération plus rapide [Dordunoo et al., 1995].

Il est intéressant de noter que Sansdrap et Moës, 1993 ont prouvé que des particules de 18 μ m chargées à 6,5, 13,3, et 22,8% en nifédipine montrent un profil de libération initial similaire. Cela indique que le pourcentage d'actif situé à la surface de la microsphère reste constant au moins pour des taux de charge compris entre 6,5 et 22,8%.

4.4.8 Influence de la localisation du principe actif

La distribution du principe actif au sein des particules affecte son profil de libération. Comme expliqué précédemment, les cinétiques de libération présentent généralement deux phases distinctes en fonction de la disponibilité de l'actif dépendant de sa localisation au sein de la particule. La première est une phase de relargage rapide aussi appelé effet « burst », attribuée à l'actif situé à la surface de la particule [Dordunoo et al., 1995 ; Yan et al., 1994 ; Jameela et al., 1997 ; Izumikawa et al., 1991]. L'effet « burst » peut être expliqué par la nature instable des gouttelettes d'émulsion qui peut mener à leur coalescence localisant le principe actif à la surface des microparticules de polymère. Le même principe est applicable aux travaux de Yang et al., 2001. En effet, les résultats montrent que les microparticules plus petites résultant de l'utilisation d'une concentration supérieure en alcool polyvinylique libèrent moins rapidement leur contenu. Le résultat inverse aurait été attendu car d'après Roy et al., 1992, la surface de contact est plus importante pour des microparticules de petits diamètres ce qui permet une libération rapide. Ce phénomène peut être expliqué par la distribution du principe actif au sein de la matrice. En effet, l'utilisation d'une concentration plus importante en alcool polyvinylique augmente la stabilité de l'émulsion permettant ainsi d'éviter la coalescence ce qui limite la localisation du principe actif à la surface des particules. De ce fait, le principe actif est davantage distribué à l'intérieur des microsphères plutôt qu'à l'extérieur ralentissant ainsi la cinétique de libération. En outre, Kakish et al., 2002 en modifiant la distribution de diltiazem au sein de ses particules d'éthylène-acétate de vinyle ont réussi à moduler la cinétique de

libération. Ils ont ainsi obtenu une libération de l'actif relativement constante sur une période de 10 heures.

4.4.9 Influence de l'état de surface de la particule

Dans le cas où la matrice polymérique a une cinétique de dégradation lente, la morphologie de la particule joue un rôle critique afin d'obtenir la cinétique de libération désirée [Edlund et Albertsson, 2000]. La présence de pores ou de cratères à la surface de la particule augmente la surface de contact favorisant la pénétration de l'eau dans la matrice enrobante et donc la dissolution et la libération du principe actif [Gautier et al., 1998 ; Das et Das., 1998]. L'influence de la porosité est notable dans l'étude de Yang et al., 2000b dans laquelle l'augmentation de la porosité des microparticules de l'acide poly(lactique-co-glycolique) permet une augmentation de la libération de l'albumine de sérum bovin 8 fois plus rapide. De même, Le Ray et al., 2003 ont mesuré des cinétiques de libération de vancomycine plus importante pour des microparticules de poly(ϵ -caprolactone) présentant des trous sur leurs surfaces. Au contraire, une surface lisse et non poreuse retarde la cinétique de libération [Bodmeier et McGinity, 1987]. Izumikawa et al., 1991 ont également démontré que pour les microsphères poreuses préparées dans des conditions d'évaporation à pression ambiante le taux de libération du principe actif est plus important que pour une pression réduite résultant en des particules lisses.

Conclusion

Parmi les techniques de microencapsulation existantes la microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple reste l'une des plus utilisée pour les principes actifs hydrophobes car elle ne nécessite pas de matériel spécifique et utilise des conditions opératoires douces (température et pression ambiante généralement). Cet état de la littérature démontre que chaque paramètre de formulation et du procédé impacte les propriétés des microparticules résultantes modifiant ainsi le profil de la cinétique de libération. La maîtrise du procédé de microencapsulation est notamment dépendante de plusieurs facteurs incluant les natures chimiques du principe actif et du polymère enrobant, la viscosité de la phase organique, le ratio principe actif/polymère, la vitesse d'agitation, la cinétique d'évaporation du solvant et l'utilisation d'agents stabilisants. La réalisation de particules suivant le procédé de microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple nécessite donc de prendre en considération de nombreux facteurs afin d'obtenir des particules conformes au cahier des charges.

Références

- [Aberturas et al., 2002] Aberturas M.R., Molpeceres J., Guzman M., Garcia F., 2002. Development of a new cyclosporine formulation based on poly (caprolactone) microspheres, *J. Microencapsul.*, 19, 61–72.
- [Al Haushey et al., 2007] Al Haushey L., Bolzinger M.A., Bordes C., Gauvrit J.Y., Briancon S., 2007. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design, *Int. J. Pharm.*, 344, 16–25.
- [Albertini et al., 2008] Albertini B., Passerini N., Pattarino F., Rodriguez L., 2008. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69, 348–357.
- [André-Abrant et al., 2001] André-Abrant A., Taverdet J.-L., Jay J., 2001. Microencapsulation par évaporation de solvant, *Eur. Polym. J.*, 37, 955–967.
- [Anwar et Kunz, 2011] Anwar S.H., Kunz B., 2011. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying, *J. Food Eng.*, 105, 367–378.
- [Arshady, 1990] Arshady R., 1990. Microspheres and microcapsules: a survey of manufacturing techniques Part II: Coacervation, *Polym. Eng. Sci.*, 30, 905–914.
- [Atkins, 1998] Atkins P.W., 1998. *Physical Chemistry*, sixth ed., Oxford University Press, Oxford, UK.
- [Backhurst et al., 1974] Backhurst J.R., Harker J.H., Porter J.E., 1974. *Problems in Heat and Mass Transfer*, Edward Arnold, London.
- [Bahl et Sah, 2000] Bahl Y., Sah H., 2000. Dynamic changes in size distribution of emulsion droplets during ethyl acetate-based microencapsulation process. *AAPS PharmSciTech*, 1, 41–49.
- [Bartkowiak et Hunkeler, 1999] Bartkowiak A., Hunkeler D., 1999. Alginate-oligochitosan microcapsules: a mechanistic study relating membrane and capsule properties to reaction conditions, *Chem. Mater.*, 11, 2486–2492.
- [Benoit et al., 1999] Benoit M.A., Baras B., Gillbard J., 1999. Preparation and characterization of protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery, *Int. J. Pharm.*, 184, 73–84.
- [Benoit et al., 2013] Benoit J.P., Richard J., Venier-Julienne M.C., 2013. Microencapsulation. *Techniques de l'ingénieur*, J2210, 1–22.
- [Berchane et al., 2006] Berchane N.S., Jebrail F.F., Carson K.H., Rice-Ficht A.C., 2006. Andrews M.J., About mean diameter and size distributions of poly(lactide-co-glycolide) (PLG) microspheres, *J. Microencapsul.*, 23, 539–552.

[Berkland et al., 2002] Berkland C., King M., Cox A., Kim K., Pack D.W., 2002. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate, *J. Control. Release*, 82, 137–147.

[Bodmeier et Chen, 1989] Bodmeier R., Chen H., 1989. Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and ketoprofen, *J. Control. Release*, 7, 69–78.

[Bodmeier et McGinity, 1987] Bodmeier R., McGinity J.W., 1987. The preparation and evaluation of drug-containing poly(d,l-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method, *Pharm. Res.*, 4, 465–471.

[Bodmeier et McGinity, 1988] Bodmeier R., McGinity J.W., 1988. Solvent selection in the preparation of poly(d,l-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method, *Int. J. Pharm.*, 43, 179–186.

[Bolourtchian et al., 2005] Bolourtchian N., Karimi K., Aboofazeli R., 2005. Preparation and characterization of ibuprofen microspheres, *J. Microencapsul.*, 22, 529–538.

[Bourgeois et al., 2010] Bourgeois S., Bolzinger M.A., Pelletier J., Valour J.P., Briançon S., 2010. Caffeine microspheres – an attractive carrier for optimum skin penetration, *Int. J. Cosmetic Sci.*, 32, 318–321.

[Broadhead et al., 1992] Broadhead J., Rouan Edmond S.K., Rhodes C.T., 1992. The spray drying of pharmaceuticals, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18, 1169–1206.

[Castellanos et al., 2001] Castellanos I.J., Carasquillo K.G., Jesus Lopez J.D., Alvarez M., Griebnow K., 2001. Encapsulation of bovine serum albumin in poly(lactide-co.glycolide) microspheres by the solid-in-oil-in-water technique, *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, 167–178.

[Charleux, 2000] Charleux B., 2000. Theoretical aspects of controlled radical polymerization in a dispersed medium. *Macromolecules*, 33, 5358–5365.

[Chávarri et al., 2010] Chávarri M., Marañón I., Ares R., Ibáñez F.C., Marzo F., Villarán M.D.C., 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate–chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions, *Int. J. Food Microbiol.*, 142, 185–189.

[Chung et al., 2001] Chung T.W., Huang Y.Y., Liu Y.Z., 2001. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLA microspheres, *Int. J. Pharm.*, 212, 161–169.

[Conti et al., 1995] Conti B., Genta I., Modena T., Pavanetto F., 1995. Investigation on process parameters involved in polylactide-co-glycolide microspheres preparation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21, 615–622.

[Crotts et Park, 1995] Crotts G., Park T.G., 1995. Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow spheres, *J. Control. Release*, 35, 91–105.

- [Das et Das, 1998] Das S.K., Das N.G., 1998. Preparation and in vitro dissolution profile of dual polymer (Eudragit™ RS100 and RL100) microparticles of diltiazem hydrochloride, *J. Microencapsul.*, 15, 445–452.
- [Dash et al., 2010] Dash S., Murthy P.N., Nath L., Chowdhury P., 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta. Pol. Pharm.*, 67, 217–23.
- [De Kruif et al., 2004] De Kruif C.G., Weinbreck F., de Vries R., 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 9, 340–349.
- [Del Gaudio et al., 2009] Del Gaudio P., Russo P., Rosaria Lauro M., Colombo P., Aquino R.P., 2009. Encapsulation of ketoprofen and ketoprofen lysinate by prilling for controlled drug release, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 10, 1178–1185.
- [Desai et Park, 2005] Desai K.G.H., Park H.J., 2005. Encapsulation of olyuri C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, *J. Microencapsul.*, 22, 179–192.
- [Dhanaraju et al., 2003] Dhanaraju M.D., Vema K., Jayakumar R., Vamsadhara C., 2003. Preparation and characterisation of injectable microspheres of contraceptive hormones, *Int. J. Pharm.*, 268, 23–29.
- [Dhanaraju et al., 2010] Dhanaraju M.D., Sathyamoorthya N., Sundar V.D., Suresh C., 2010. Preparation of poly (epsilon-caprolactone) microspheres containing etoposide by solvent evaporation method, *Asian J. Pharm. Sci.*, 5, 114–122.
- [Diego-Taboada et al., 2013] Diego-Taboada A., Maillet L., Banoub J.H., Lorch M., Rigby A.S., Boa A.N., Mackenzi G., 2013. Protein free microcapsules obtained from plant spores as a model for drug delivery: Ibuprofen encapsulation, release and taste masking, *J. Mater. Chem.*, 1, 707–713.
- [Dordunoo et al., 1995] Dordunoo S.K., Jackson J.K., Arsenault L.A., Oktaba A.M., Hunter W.L., Burt H.M., 1995. Taxol encapsulation in poly (epsilon-caprolactone) microspheres, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 36 279–282.
- [Dubernet et al., 1987] Dubernet C., Benoit J.P., Couarraze G., Duchene D., 1987. Microencapsulation of nitrofurantoin in poly (ε-caprolactone): tableting and in vitro release studies, *Int. J. Pharm.*, 35, 145–156.
- [Dubernet et al., 1991] Dubernet C., Rouland J.C., Benoit J.P., 1991. Ibuprofen-loaded ethylcellulose microspheres: analysis of the matrix structure by thermal analysis, *J. Pharm Sci.*, 80, 1029–1033.
- [Duclairoir et al., 2002] Duclairoir C., Orecchioni A.M., Depraetere P., Nakache E., 2002. α-Tocopherol encapsulation and in vitro release from wheat gliadin nanoparticles, *J. Microencapsul.*, 19, 53–60.
- [Edlund et Albertsson, 2000] Edlund U., Albertsson A.C., 2000. Morphology engineering of a novel poly(l-lactide)/poly(1,5-dioxepane-2-one) microsphere system for controlled drug delivery, *J. Polym. Sci.: Part A: Pol. Chem*, 38, 786–796.

[Fernández-Carballido et al., 2004] Fernández-Carballido A., Herrero-Vanrell R., Molina-Martinez I.T., Pastoriza P., 2004. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intra-articular administration: effect of Labrafil addition on release in vitro, *Int. J. Pharm.*, 279, 33–41.

[Freiberg et Zhu, 2004] Freiberg S., Zhu X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release, *Int. J. Pharm.*, 282, 1–18.

[Freitas et al., 2005] Freitas S., Merkle H.P., Gander B., 2005. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J. Control. Release*, 102, 313–332.

[Freytag et al., 2000] Freytag T., Dashevsky A., Tillman L., Hardee G.E., Bodmeier R., 2000. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres, *J. Control. Release*, 69, 197–207.

[Fuchs et al., 2006] Fuchs M., Turchiuli C., Bohin M., Cuvelier M.E., Ordonnaud C., Peyrat-Maillard M.N., 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration, *J. Food Eng.*, 75, 27–35.

[Gabor, 1999] Gabor F., 1999. Ketoprofen-poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics, *J. Microencapsul.*, 16, 1–12.

[Gautier et al., 1998] Gautier H., Guicheux J., Grimandi G., Faivre A., Daculsi G., Merle C., 1998. In vitro influence of apatite-granule-specific area on human growth hormone loading and release, *J. Biomed. Mater. Res.*, 40, 606–613.

[Ghaderi et al., 1996] Ghaderi R., Stureson C., Carlfors J., 1996. Effect of preparative parameters on the characteristics of poly d, l-lactide-co-glycolide) microspheres made by the double emulsion method. *Int. J. Pharm.*, 141, 205–216.

[Gharsallaoui et al., 2007] Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, 40, 1107–1121.

[Gouin, 2004] Gouin, S., 2004. Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends Food Tech.*, 15, 330–347.

[Grandfils et al., 1992] Grandfils C., Flandroy P., Nihant N., Barbette S., Jerome R., Teyssie P., Thibaut A., 1992. Preparation of poly (D,L) lactide microspheres by emulsion-solvent evaporation, and their clinical applications as a convenient embolic material, *J. Biomed. Mater. Res.*, 26, 467–479.

[Green et Scheleicher, 1956] Green B.K., Scheleicher, L., Manifold record material. 1956, [US2730456].

[Gupta et al., 2001] Gupta V.S., Beckert T.E., Price J.C., 2001. A novel pH- and time-based multi-unit potential colonic drug delivery system. I. Development, *Int. J. Pharm.*, 213, 83–91.

- [Gupta et Ravi, 2001] Gupta K.C., Ravi Kumar M.N.V., 2001. pH dependent hydrolysis and drug release behavior of chitosan/poly(ethylene glycol) polymer network microspheres, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 12, 753–759.
- [Hamishehkar et al., 2009] Hamishehkar H., Emami J., Najafabadi A.R., Gilani K., Minaiyan M., Mahdavi H., Nokhodchi A., 2009. The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 74, 340–349.
- [Herrmann et Bodmeier, 1998] Herrmann J., Bodmeier R., 1998. Biodegradable somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45, 75–82
- [Hinze, 1955] Hinze J.O., 1955. Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion processes, *AIChE J*, 1, 289–295.
- [Huang et al., 1997] Huang Y.Y., Chung T.W., Tzeng T.W., 1997. Drug release from PLA/PEG microparticulates, *Int. J. Pharm.*, 156, 9–15.
- [Izumikawa et al., 1991] Izumikawa S., Yoshioka S., Aso Y., Takeda Y., 1991. Preparation of poly(l-lactide) microspheres of different crystalline morphology on drug release rate, *J. Control Release*, 15, 133–140.
- [Jacquot et al., 2003] Jacquot M., Perneti M., 2003. Spray coating and drying processes. *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*, 343–356. Springer Netherlands.
- [Jalil et Nixon, 1990a] Jalil R., Nixon, J.R., 1990. Microencapsulation using poly(l-lactic acid) II: preparative variables affecting microcapsule properties, *J. Microencapsul.*, 7, 25–39.
- [Jalil et Nixon, 1990b] Jalil R., Nixon J.R., 1990. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid) III: Effect of polymer molecular weight on the release kinetics, *J. Microencapsul.*, 7, 357–374.
- [Jameela et al., 1997] Jameela S.R., Suma N., Jayakrishana A., 1997. Protein release from poly (epsilon-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study. *J. Biomater. Sci. Polym.*, 8, 457–466.
- [Jameela et al., 1997] Jameela S.R., Suma N., Jayakrishana A., 1997. Protein release from poly (epsilon-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study, *J. Biomater. Sci. Polym.*, 8, 457–466.
- [Janssen et al., 1993] Janssen L.J.J.M., Boersma A., Te Nijenhuis K., 1993. Encapsulation by interfacial polycondensation: III. Microencapsulation, the influence of process conditions on wall permeability, *J. Membr. Sci.*, 79, 11–26.
- [Jeffery et al., 1991] Jeffery H., Davis S.S., O'Hagan D.T., 1991. The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation, *Int. J. Pharm.*, 77, 169–175.

[Jeffery et al., 1993] Jeffery H., Davis S.S., O'Hagan D.T., 1993. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles: II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in water emulsion solvent evaporation technique, *Pharm. Res.*, 10, 362–368.

[Jeong et al., 2003] Jeong J.C., Lee J., Cho K., 2003. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Rel.*, 92, 249–258.

[Jeyanthi et al., 1997] Jeyanthi R., Mehta R.C., Thanoo B.C., DeLuca P.P., 1997. Effect of processing parameters on the properties of peptide-containing PLGA microspheres, *J. Microencapsul.*, 14, 163–174.

[Jiang et Schwendeman, 2001] Jiang W., Schwendeman S.P., 2001. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in Poly(d,l-lactide) and Poly(ethylene glycol) microsphere blends, *Pharmaceutical Research*, 18, 878–885.

[Jones et Pearce, 1995] Jones D.S, Pearce K.J, 1995. An investigation of the effects of some process variables on the microencapsulation of propranolol hydrochloride by the solvent evaporation method, *Int. J. Pharm.*, 118, 199–205.

[Junyaprasert et al., 2001] Junyaprasert V.B, Mitrevej A., Sinchaipanid N., Boonme P., Wurster D.E., 2001. Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27, 561–566.

[Kakish et al., 2002] Kakish H.F., Tashtoush B., Ibrahim H.G., Najib N.M., 2002. A novel approach for the preparation of highly loaded polymeric controlled release dosage forms of diltiazem HCl and diclofenac sodium, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 54, 75–81.

[Kerdudo, 2014] Kerdudo A., 2014. Optimisation de la conservation des cosmétiques: impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation. Thèse de doctorat. Nice.

[Kilicarslan et Baykara, 2003] Kilicarslan M., Baykara T., 2003. The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres, *Int. J. Pharm.*, 252, 99–109.

[Killeen, 1993] Killeen M.J., 1993. The process of spray drying and spray congealing, *ISPE*, 13, 56–56.

[Kim et al., 2005] Kim B.K., Hwang S.J., Park J.B., Park H.J., 2005. Characteristics of felodipine-located poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Microencapsul.*, 22, 193–203.

[Lalla et Sapna, 1993] Lalla J.K., Sapna K., 1993. Biodegradable microspheres of poly(dl-lactic acid) containing piroxicam as a model drug for controlled release via the parenteral route, *J. Microencapsul.*, 10, 449–460.

[Lazko et al., 2004] Lazko J., Popineau Y., Legrand J., 2004. Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 37, 1–8.

- [Le Ray et al., 2003] Le Ray A.M., Chiffolleau S., Iooss P., Grimandi G., Gouyette A., Daculsi G., Merle C., 2003. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility, *Biomaterials*, 24, 443–449.
- [Leclercq et Reineccius, 2009] Leclercq S., Milo C., Reineccius G., 2009. Effects of cross-linking, capsule wall thickness, and compound hydrophobicity on aroma release from complex coacervate microcapsules, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1426–1432.
- [LeCorre et al., 1994] LeCorre P., LeGuevello P., Gajan V., Chevanne F., LeVerge R., 1994. Preparation and characterization of bupivacaine-loaded polylactide and polylactide-co-glycolide microspheres, *Int. J. Pharm*, 107, 41–49.
- [Lemetter et al., 2009] Lemetter C.Y.G., Meeuse F.M., Zuidam N.J., 2009. Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up, *AIChE Journal*, 55, 1487–1496.
- [Li et al., 1995 a] Li W.-I., Anderson K.W., Mehta R.C., DeLuca P.P., 1995. Prediction of solvent removal profile and effect on properties for peptide loaded PLGA microspheres prepared by solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Release*, 37, 199–214.
- [Li et al., 1995b] Li W.I., Anderson K.W., DeLuca P.P., 1995b. Kinetic and thermodynamic modeling of the formation of polymeric microspheres using solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Release*, 37, 187–198.
- [Li et al., 2008] Li M., Rouaud O., Poncelet D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches, *Int. J. Pharm.*, 363, 26–39.
- [Li, 2009] Li M., 2009. Microencapsulation par évaporation de solvant. Thèse de doctorat. Nantes.
- [Liggins et al., 2000] Liggins R.T., D'Amours S., Demetrick J.S., Machan L.S., Burt H.M., 2000. Paclitaxel loaded poly(l-lactic acid) microspheres for the prevention of intraperitoneal carcinomatosis after a surgical repair and tumor cell spill, *Biomaterials*, 21, 1959–1969.
- [Lin et Huang, 2001] Lin W.J., Huang L.I., 2001. Influence of pluronics on protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles, *J. Microencapsul.*, 18, 191–197.
- [Lin et Yu, 2000] Lin W.J., Yu C.C., 2000. Comparison of protein loaded poly (ϵ -caprolactone) microparticles prepared by the hot-melt technique. *J. Microencapsul.*, 18, 585–592.
- [Maa et al., 1998] Maa Y.F., Nguyen P.A., Hsu S.W., 1998. Spray-drying of air-liquid interface sensitive recombinant human growth hormone, *J. Pharm. Sci.*, 87, 152–159.

[Madan et al., 1972] Madan P.L., Luzzi L.A., Price J.C., 1972. Factors influencing microencapsulation of a waxy solid by complex coacervation, *J. Pharm. Sci.*, 61, 1586–1588.

[Maia et al., 2004] Maia J.L., Santana M.H.A., Ré M.I., 2004. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Braz. J. Chem. Eng.*, 21, 01–12.

[Makino et al., 2000] Makino K., Mogi T., Ohtake N., Yoshida M., Ando S., Nakajima T., Ohshima H., 2000. Pulsatile drug release from poly (lactide-co-glycolide) microspheres: how does the composition of the polymer matrices affect the time interval between the initial burst and the pulsatile release of drugs?, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 19, 173–179.

[Malamataris et Avgerinos, 1990] Malamataris S., Avgerinos A., 1990. Controlled release indomethacin microspheres prepared by using an emulsion solvent-diffusion technique, *Int. J. Pharm.*, 62, 105–111.

[Marsanasco et al., 2011] Marsanasco M., Márquez A.L., Wagner J.R., del V. Alonso S., Chiaramoni N.S., 2011. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment, *Food Res. Int.*, 44, 3039–3046.

[Mateovic et al., 2002] Mateovic T., Kriznar B., Bogataj M., Mrhar A., 2002. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *J. Microencapsul.*, 19, 29–36.

[Mathieu, 2003] Mathieu É., 2003. Étude de la microencapsulation par coacervation complexe utilisant des dérivés acryliques. Thèse de doctorat. Nantes.

[Mathiowitz, 1999] Mathiowitz E., 1999. *Encyclopedia of controlled drug delivery* (Vol. 2). Wiley-Interscience.

[Matsuura et al., 2011] Matsuura S., Ishii R., Itoh T., Hamakawa S., Tsunoda T., Hanaoka T., Mizukami F., 2011. Immobilization of enzyme-encapsulated nanoporous material in a microreactor and reaction analysis, *Chem. Eng. J.*, 167, 744–749.

[Mauguet et al., 2002] Mauguet M.C., Legrand J., Brujes L., Carnelle G., Larre C., Popineau Y., 2002. Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method, *J. Microencapsul.*, 19, 377–384.

[Mi et al. 2002] Mi F.L., Lin Y.M., Wu Y.B., Shyu S.S., Tsai Y.H., 2002. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, *Biomaterials*, 23, 3257–3267.

[Miyajima et al., 1997] Miyajima M., Koshika A., Okada J., Ikeda M., Nishimura K., 1997. Effect of polymer crystallinity on papaverine release from poly(l-lactic acid) matrix, *J. Control. Release*, 49, 207–215.

[Monshipouri et Neufeld, 1991] Monshipouri M., Neufeld R., 1991. Activity and distribution of urease following microencapsulation within polyamide membranes, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 309–313.

[Narayani et Rao, 1996] Narayani R., Rao K.P., 1996. Gelatin microsphere cocktails of different sizes for the controlled release of anticancer drugs. *Int. J. Pharm.*, 143, 255–258.

[Navarro et al., 2012] Navarro F.P., Berger M., Guillermet S., Josserand V., Guyon L., Neumann E., Vinet F., Texier I., 2012. Lipid nanoparticle vectorization of indocyanine green improves fluorescence imaging for tumor diagnosis and lymph node resection, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 8, 730–741.

[Obeidat et Price, 2006] Obeidat W.M., Price J.C., 2006. Preparation and evaluation of Eudragit S 100 microspheres as pH-sensitive release preparations for piroxicam and theophylline using the emulsion-solvent evaporation method, *J. Microencapsul.*, 23, 195–202.

[O'Donnel et McGinity, 1997] O'Donnel P.B., McGinity J.W., 1997. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 28, 25–42.

[Okada et al., 1994] Okada H., Yamamoto M., Heya T., Inoue Y., Kamei S., Ogawa Y., Toguchi H., 1994. Drug delivery using biodegradable microspheres, *J. Control. Release*, 28, 121–129.

[Okada, 1997] Okada H., 1997. One and three month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate, *Adv. Drug Del. Rev.*, 28, 43–70.

[Pandya et al., 2008] Pandya P., Gattani S., Jain P., Khirwal L., Surana S., 2008. Co-solvent Evaporation Method for Enhancement of Solubility and Dissolution Rate of Poorly Aqueous Soluble Drug Simvastatin : In vitro–In vivo Evaluation, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 9, 1247–1252.

[Passerini et al., 2003] Passerini N., Perissuti B., Albertini B., Voinovich D., Moneghini M., Rodriguez L., 2003. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing, *J. Control. Release*, 88, 263–275.

[Perez et al., 2000] Perez M.H., Zinutti C., Lamprecht A., Ubrich N., Astier A., Hoffman M., Bodmeier R., Maincent P., 2000. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both lipophilic and hydrophilic drug, *J. Control. Rel.*, 65, 429–438.

[Plosker et Brogden, 1994] Plosker G. L., Brogden R. N., 1994. Leuporelin. A review of its pharmacology and therapeutic use in prostatic cancer, *Drugs*, 48, 930–967.

[Poe et al., 2007] Poe S.L., Kobaslija M., McQuade T., 2007. Mechanism and application of a microcapsule enabled multicatalyst reaction., *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 9216–9221.

[Poncelet, 2006] Poncelet D., 2006. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications, J. Blitz, V. Gun'ko (Eds.), Surface chemistry in biomedical and environmental science, Springer, Netherlands, 23–24.

[Rafati et al., 1997] Rafati H., Coombes A.G., Adler J., Holland J., 1997. Davis S.S., Protein-loaded poly(dl-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics, J. Control. Release, 43, 89–102.

[Raymond et al., 2004] Raymond M.C., Neufeld R.J., Poncelet D., 2004. Encapsulation of brewers yeast in chitosan coated carrageenan microspheres by emulsification/thermal gelation, Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol., 32, 275–291.

[Ré, 1998] Ré M., 1998. Microencapsulation by spray drying. Drying technol., 16, 1195–1236.

[Rodriguez et al., 1998] Rodriguez M., Vila Jato J.L., Torres D., 1998. Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region, J. Control. Release, 55, 67–77.

[Rosa et al., 2000] Rosa G.D., Iommelli R., La Rotonda M.I., Miro A., Quaglia F., 2000. Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres. J. Control. Release, 69, 283–295.

[Roy et al., 1992] Roy S., Pal M., Gupta B.J., 1992. Indomethacin-loaded microspheres: design and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation, Pharm. Res., 9, 1132–1136.

[Sah et al., 1994] Sah H., Toddywala R., Chien Y.W., 1994. The influence of biodegradable micro-encapsule formations on controlled release of a protein. J. Control. Release 30, 201–211.

[Sah, 1997] Sah H., 1997. Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres, J. Control. Release, 47, 233–245

[Sah, 2000] Sah H., 2000. Ethyl formate—alternative dispersed solvent useful in preparing PLGA microspheres, Int. J. Pharm., 195, 103–113.

[Sanders et al., 1985] Sanders L.M., McRae G.I., Vitale K.M., Kell B.A., 1985. Controlled delivery of LHRH analogues from biodegradable injectable microspheres, J. Control. Release, 2, 187–195.

[Sanna et al., 2015] Sanna V., Roggio A.M., Pala N., Marceddu S., Lubinu G., Mariani A., Sechi M., 2015. Effect of chitosan concentration on PLGA microcapsules for controlled release and stability of resveratrol, Int. J. Biol. Macromol., 72, 531–536.

[Sansdrap et Moës, 1993] Sansdrap P., Moës A.J., 1993. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres, Int. J. Pharm., 98, 157–164.

- [Sansdrap et Moës, 1997] Sansdrap P., Moes A.J., 1997. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Release*, 43, 47–58.
- [Sastre et al., 2004] Sastre R.L., Blanco M.D., Teijo C., Olmo R., Teijon J.M., 2004. Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded poly(epsilon-caprolactone) microspheres for drug administration, *Drug Dev. Res.*, 63, 41–53.
- [Schugens et al., 1994] C. Schugens, N. Laruelle, N. Nihant, C Grandfils, R. Jerome, P. Teyssié, 1994. Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly l-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation, *J. Control. Release*, 32, 161–176.
- [Séquier, 2013] Séquier F., 2013. Technologie de prilling: des principes fondamentaux du procédé au développement de microsphères lipidiques. Thèse de doctorat. Paris 11.
- [Shinha et Trehan, 2005] Shinha V.R., Trehan A., 2005. Formulation, characterization, and evaluation of ketorolac tromethamine-loaded biodegradable microspheres, *Drug. Deliv.*, 12, 133–139.
- [Shu et al., 2006] Shu B., Yu W., Zhao Y., Liu X., 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J. Food Eng.*, 76, 664–669.
- [Siow et Ong, 2013] Siow LF., Ong CS., 2013. Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation, *J. Food Process. Technol.*, 4, 1–9.
- [Smith et Herbig, 2002] Smith K.L., Herbig S.M., 1992. Controlled release. *Membrane Handbook*, 915–935. Springer US.
- [Sohi et al., 2004] Sohi H., Sultana Y., Khar R.K., 2004. Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 30, 429–448.
- [Soottitantawat et al., 2005] Soottitantawat A., Takayama K., Okamura K., Muranaka D., Yoshii H., Furuta T., Ohkawara M., Linko P., 2005. Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 6, 163–170.
- [Specos et al., 2010] M.M. Specos, J.J. Garcia, J. Tornesello, P. Marinao, Vecchia M.D., Tesoriero M.V.D., Hermida L.G., 2010. Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 104, 653–658.
- [Stevanović et al., 2007] Stevanović M., Savić J., Jordović B., Uskoković D., 2007. Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 59, 215–223.
- [Suave et al., 2010] Suave J., Dall'Agnol E.C., Pezzin A.P.T., Meier M.M., Silva D.A.K., 2010. Biodegradable microspheres of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ε-

caprolactone) loaded with Malathion pesticide: preparation, characterization, and in vitro controlled release testing, *J. Appl. Polym. Sci.*, 117 3419–3427.

[Thies, 1987] Thies, C., 1987. Microencapsulation. *Encyclopedia Pol. Sci. Eng.*, 9, 724–745.

[Thompson et al., 2007] Thompson C. J., Hansford D., Higgins S., Rostron C., Hutcheon G.A., Munday D.L., 2007. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. *Int. J. Pharm.*, 329, 53–61.

[Vandamme et al., 2007] Vandamme T., Poncelet D., Subra-Paternault P., 2007. Microencapsulation des sciences aux technologies, TEC & DOC, Paris.

[Witchi et Doelker, 1998] Witchi C., Doelker E., 1998. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing, *J. Control Release*, 51, 327–341.

[Yamaguchi et al., 2002] Yamaguchi Y., Takenaga M., Kitagawa A., Ogawa Y., Mizushima Y., Igarashi R., 2002. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives, *J. Control Release*, 81, 235–249.

[Yan et al., 1994] Yan C., Resau J.H., Hewetson J., West M., Rill W.L., Kende M., 1994. Characterization and morphological analysis of protein loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique, *J. Control. Release*, 32, 231–241.

[Yang et al., 2000a] Yang C.Y., Tsay S.Y., Tsiang R.C.C., 2000. An enhanced process for encapsulating aspirin in ethylcellulose microcapsules by solvent evaporation in an O/W emulsion, *J. Microencapsul.*, 17, 269–277.

[Yang et al., 2000b] Yang Y.Y., Chung, T.S., Bai, X.L., Chan, W.K., 2000. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chem. Eng. Sci.*, 55, 2223–2236.

[Yang et al., 2001] Yang Y.Y., Chung T.S., Ng N.P., 2001. Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials*, 22, 231–241.

[Yang et al., 2003] Yang J.H., Lee S.Y., Han Y.S., Park K.C., Choy J.H., 2003. Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanocapsule, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 24, 499–503.

[Yoo et al., 2006] Yoo S.H., Song Y.B., Chang P.S., Lee H.G., 2006. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties, *Int. J. Biol. Macromol.*, 38, 25–30.

[Zhang et al., 2005] Zhang J.X., Zhu K.J., Chen D., 2005. Preparation of bovine serum albumin loaded poly (d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres by a modified phase separation technique, *J. Microencapsul.*, 22, 117–126.

[Zhu et al., 2005] Zhu K.J., Li Y., Jiang H.L., Yasuda H., Ichimaru A., Yamamoto K., Lecomte P., Jerome R., 2005. Preparation, characterization and in vitro release properties of ibuprofen-loaded microspheres based on polylactide, poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers, *J. Microencapsul.*, 22, 25–36.

[Zhu, 2007] Zhu Y., 2007. Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels, S.T. Yang (Ed.), *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, Elsevier B.V., 373–396.

Etude bibliographique

Chapitre II :

La conservation des formulations

Introduction

Il est indispensable de protéger tout produit des contaminations microbiennes afin d'assurer une durée de vie suffisante mais également une sécurité d'utilisation au consommateur. Pour cela des agents antimicrobiens, aussi appelés conservateurs sont introduits au sein des formules et permettent de protéger les produits des contaminations provenant notamment du contact avec le consommateur lors du prélèvement. L'objectif pour les industriels est donc de proposer un produit dont le système de conservation protège de toute prolifération microbienne avant et pendant son utilisation.

L'efficacité d'un conservateur au sein d'une formule dépend entre autres du pH du milieu, la quantité en eau du produit, de la dose d'emploi de l'agent antimicrobien et de son coefficient de répartition, ainsi que du conditionnement. Les paramètres favorisant la prolifération des micro-organismes étant connus, des solutions peuvent être mises en place afin de la limiter ou l'inhiber.

Ce chapitre bibliographique est consacré à l'étude de la conservation des formulations que ce soit en cosmétique, en pharmaceutique ou encore en agro-alimentaire. Il y sera abordé les notions fondamentales concernant les micro-organismes et les agents antimicrobiens. Une attention particulière sera portée sur les facteurs influençant l'activité antimicrobienne d'un conservateur.

1. Les contaminations

1.1 Origines

Il existe différents types de contaminations: les contaminations primaires qui peuvent survenir lors de la fabrication et les contaminations secondaires qui surviennent après. Les contaminations primaires peuvent être la conséquence : des matières premières utilisées, des locaux, du matériel ou encore du personnel chargé de la fabrication. Les contaminations secondaires résultent quant à elles de l'utilisation du produit par le consommateur. Afin d'éviter tout contact entre le consommateur et les micro-organismes potentiellement pathogènes, chaque produit mis sur marché comporte sur son récipient et son emballage la mention d'une date de durabilité minimale. La date de durabilité minimale (DDM), la période après ouverture (PAO), ou encore date limite de consommation (DLC), indiquent la date jusqu'à laquelle le produit peut être utilisé ou consommé sans dommage pour le consommateur. Au-delà de cette date son utilisation ou sa consommation ne sont plus garanties. Il est à noter que, dans le milieu cosmétique, la date de péremption après ouverture n'est pas obligatoire pour les produits dont la durée de vie est inférieure à 30 mois.

1.2 Les règles de Bonnes Pratiques de Fabrication

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) garantissent que les produits soient fabriqués, conditionnés, contrôlés et stockés dans des conditions adaptées à leur utilisation et leur spécificité. Elles décrivent l'ensemble des activités de l'unité de production et permettent de garantir la conformité du produit, notamment par la maîtrise des facteurs humains, techniques et administratifs. Elles visent en particulier à assurer le respect des critères d'hygiène. Les bonnes pratiques de fabrication sont référencées dans des directives européennes qui sont propres à chaque domaine d'application. Il est notamment possible de citer la directive 2003/94/CE du 8 octobre 2003 pour le domaine pharmaceutique et le règlement CE n°1223/2009 du 30 novembre 2009 pour les cosmétiques.

2. Les micro-organismes

Le terme micro-organisme fait référence à un organisme de taille microscopique comme les bactéries ou les champignons (moisissures et levures). Les micro-organismes sont classés en fonction de leur structure cellulaire et il est possible de distinguer les procaryotes des eucaryotes (tableau BII.1). Les procaryotes possèdent un matériel génétique situé directement dans le cytoplasme de la cellule alors qu'au contraire pour les eucaryotes il est contenu dans un noyau [Willey, 2008].

Tableau BII.1. Caractéristiques des différents types de micro-organismes [Nicklin et al., 2000].

Micro-organisme	Taille approximative	Nature des cellules
Bactérie	0.1 μm - 10 μm	Procaryote
Mycètes	2 μm - 10 μm	Eucaryote

2.1 Les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes de petits diamètres entre 0.1 μm et 10 μm qui sont unicellulaires appartenant à un groupe appelé procaryote car leur unique chromosome n'est pas entouré d'une membrane nucléaire. Leur structure cellulaire est simple et il y manque notamment de nombreux organites et des structures internes que l'on trouve dans les cellules eucaryotes [Nicklin et al., 2000]. Malgré cette simplicité structurelle, il existe une grande diversité dans la forme des cellules lorsqu'elles sont observées au microscope. Deux formes cellulaires prédominent : sphérique (*coccus*) et en bâtonnet (*bacillus*), mais il existe d'autres formes tels que en spirale (*spirillum*) ou encore en virgule (*vibrio*) par exemple.

Le cytoplasme de toutes les bactéries est entouré par une membrane plasmique externe revêtue d'une paroi cellulaire rigide constituée de sucres et d'acides aminés, appelée peptidoglycane. Le rôle de cette paroi bactérienne est de donner à la bactérie sa forme et de protéger la cellule contre une désintégration liée à la pression osmotique notamment [Backer et al., 2007].

Les bactéries sont divisées en deux groupes sur la base de leur réaction à un colorant établie par Christian Gram en 1884 [Beveridge, 2001]. La réaction à la coloration est liée à la structure de l'enveloppe cellulaire de ces deux groupes de bactéries. Les bactéries Gram positives (Gram +) ont une membrane plasmique entourée par une couche épaisse de peptidoglycane (20-80nm). Les bactéries Gram négatives (Gram -) possèdent une fine couche de peptidoglycane (1-3nm) mais elle est entourée d'une membrane externe supplémentaire constituée de lipopolysaccharides agissant comme une barrière (figure BII.1, Nicklin et al., 2000).

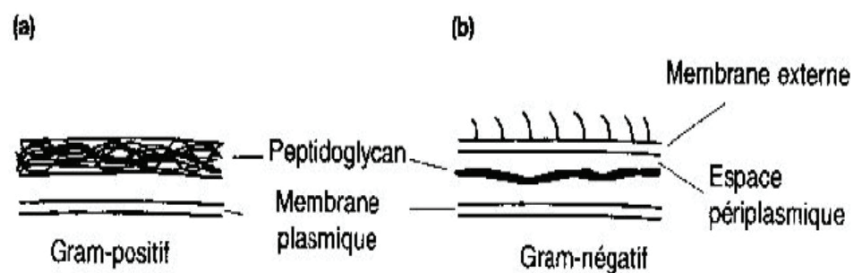


Figure BII.1. Structure de la surface d'une cellule bactérienne : a. Gram positif ; b. Gram négatif [Nicklin et al., 2000].

2.2 Les champignons microscopiques

Les champignons microscopiques se divisent en deux groupes :

- les champignons unicellulaires ou levures
- les champignons pluricellulaires ou moisissures

2.2.1 Les levures

Les levures sont des champignons microscopiques de type unicellulaire ou présentant dans leur cycle biologique une phase unicellulaire prépondérante. Elles se multiplient par scission binaire ou par bourgeonnement donnant naissance à de nouveaux individus à partir d'une cellule mère [Backer et al., 2007]. La structure de la cellule est constituée de trois couches : une membrane plasmique, un espace périplasmique et une membrane externe [Klis, 1994]. En tant qu'eucaryotes, elles possèdent un noyau clairement délimité. La forme végétative des levures peut être caractérisée par les termes sphérique, globuleuse, allongée ou encore cylindrique.

2.2.2 Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques pluricellulaires possédant des structures filamenteuses qui peuvent être plus ou moins ramifiées appelées hyphes. Les hyphes se multiplient au niveau de leurs extrémités, formant ainsi une masse emmêlée appelée mycélium. Chaque hyphe est composée d'une paroi cellulaire externe et d'un espace interne délimitant la membrane plasmique [Nicklin et al., 2000].

2.3 La croissance microbienne

La croissance microbienne est divisée en plusieurs cycles différents (figure BII.2).

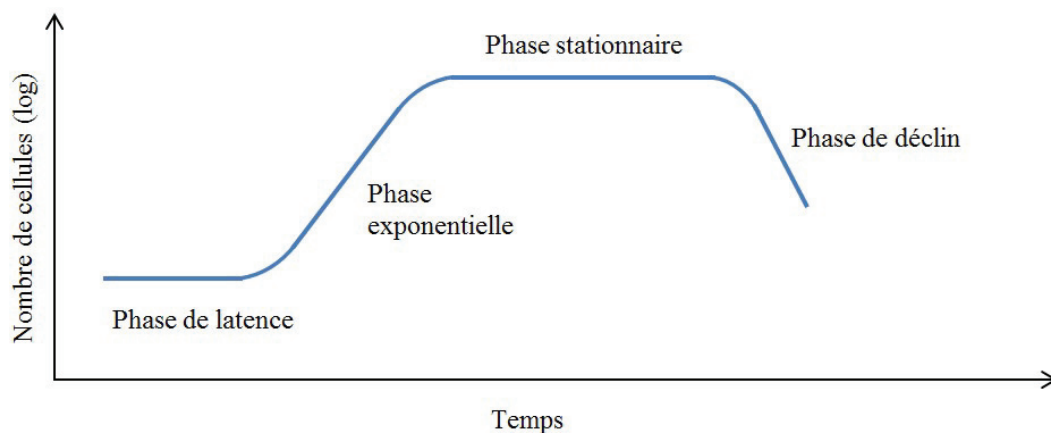


Figure BII.2. Cycle de croissance microbienne, adapté à partir de Panikov, 1995.

➤ La phase de latence

La phase de latence suit l'introduction des micro-organismes dans le milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise les éléments nécessaires afin de métaboliser les substrats présents dans le milieu lui permettant de se développer. Au cours de cette phase il n'y a pas de reproduction cellulaire. La durée de cette phase dépend principalement de l'âge des cellules et de la composition du milieu de culture.

➤ La phase exponentielle

Lorsque la phase d'adaptation précédente est terminée, la reproduction cellulaire commence et ce de manière très rapide de par une abondance des ressources nutritives. La croissance exponentielle s'arrête lorsque le milieu de culture s'épuise en composés nécessaires au développement microbien.

➤ La phase stationnaire

Après la phase exponentielle, il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'auto-destruction des micro-organismes. Les micro-organismes qui se multiplient compensent ceux qui meurent. La phase stationnaire représente donc l'étape du cycle de croissance microbien pour laquelle la concentration cellulaire maximale est atteinte et reste constante.

➤ La phase de déclin

La dernière étape est une phase de décroissance pour laquelle toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il se produit donc une diminution de cellules viables du fait du taux de mortalité qui augmente progressivement.

3 Les challenge tests

Le challenge test est une technique expérimentale suivant un protocole précis qui permet de démontrer l'efficacité du système conservateur présent dans la formule. Il existe différentes normes définissant les tests d'efficacité de la conservation antimicrobienne en fonction du domaine d'application. La norme NF EN ISO 11930 est utilisée afin d'évaluer la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique et la pharmacopée européenne 8.0-5.1.3 et 5.1.4 ou US – USP 51 représente la référence pour le domaine pharmaceutique. Quelle que soit la norme utilisée, le challenge test consiste en l'inoculation volontaire d'une concentration connue de micro-organismes de référence dans des conditions bien définies à température contrôlée. Les challenges tests utilisent comme micro-organismes de test les souches pathogènes pour l'être humain à savoir :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus niger/brasiliensis* ATCC 16404

Après la contamination, les bactéries, les levures et les moisissures sont dénombrées par analyse microbiologique à différents intervalles de temps qui sont en général le deuxième jour, le septième, le quatorzième ainsi que le vingt-huitième jour. En fonction du pourcentage de diminution dans le temps, on en déduit l'efficacité du système conservateur. Cela permet de déterminer si le produit mis à la disposition du consommateur ne présente pas de risque. Selon la norme utilisée et les résultats du test il existe différents critères d'acceptation (tableau BII.2). Le profil A satisfait aux exigences de protection antimicrobienne tandis que pour le profil B des

éléments supplémentaires justifiant un niveau de maîtrise du risque microbiologique doivent être démontrés (conditionnement par exemple).

Tableau BII.2. Critères d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne d'un produit cosmétique (norme NF EN ISO 11930). Avec NI = No Increase c'est-à-dire pas d'augmentation de la population microbienne par rapport au temps d'analyse précédent [Pasquet et al., 2015].

Temps d'analyse	Souche microbienne								
	Bactéries			Levures			Moisissures		
	7 jours	14 jours	28 jours	7 jours	14 jours	28 jours	7 jours	14 jours	28 jours
Critère A	≥ 3 log	NI	NI	≥ 1 log	NI	NI	NI	NI	NI
Critère B		≥ 3 log	NI		≥ 1 log	NI	NI	NI	NI

4 La protection contre les micro-organismes

4.1 La stérilisation

La stérilisation est l'acte utilisant un procédé physique ou chimique qui vise à éliminer les micro-organismes [Block, 2001]. Des techniques de stérilisation utilisant des traitements thermiques comme la stérilisation haute température notamment peuvent être utilisées. Elles ont l'avantage d'être simples à mettre en place mais nécessitent des produits thermorésistants [Silindir et Ozer, 2009]. Il existe plusieurs principes de stérilisation basse température tels que les traitements chimiques ou la stérilisation par rayonnements ionisants. Les traitements chimiques sont souvent réalisés avec l'oxyde d'éthylène qui est préférentiellement utilisé pour des produits thermosensibles mais qui a l'inconvénient majeur d'être toxique et cancérigène [Silindir et Ozer, 2009]. Les traitements par rayonnements ionisants sont effectués par une exposition à des rayonnements gamma ou à un faisceau d'électron [Gopal et al., 1988]. Ils ont l'avantage d'être appliqués sur le produit dans son contenant final sans générer une augmentation significative de la température [Zaied et al., 2007].

La protection des formulations par stérilisation permet de détruire les contaminations primaires mais ce procédé reste encore marginal car il est coûteux et nécessite un matériel spécifique. De plus, la stérilisation ne protège pas contre les contaminations secondaires. Il est donc plus usuellement utilisé des agents antimicrobiens afin de prévenir les différents types de contaminations.

4.2 Les agents antimicrobiens

4.2.1 Définition et objectif

Les contaminations microbiennes résultent en la dégradation anticipée du produit le rendant inapte à l'utilisation, et possiblement dangereux pour le consommateur. Les agents antimicrobiens, aussi appelés conservateurs, permettent de lutter contre les dégradations d'origine bactérienne ou fongique (champignons) apportées lors d'une contamination. Les conservateurs bactériostatiques et fongistatiques empêchent le développement des bactéries et des champignons respectivement, tandis que les bactéricides et fongicides les tuent. Les agents antimicrobiens sont donc utilisés dans les formulations seuls ou en mélange afin de prolonger la durée de vie du produit et d'assurer au consommateur la sécurité d'utilisation.

4.2.2 Mécanisme d'action

L'action du conservateur est souvent complexe et peut être localisé au niveau des parois bactériennes, des membranes, au niveau ribosomal sur la synthèse des protéines, ou au niveau des acides nucléiques et des enzymes associées [Nicklin et al., 2000]. Chaque conservateur ou famille de conservateurs possède un site d'action spécifique situé à un niveau déterminé de la structure ou du métabolisme du micro-organisme. Le micro-organisme sera plus ou moins sensible aux agents antimicrobiens en fonction de la nature de la paroi du micro-organisme et de la lipophilie des conservateurs [Kabara, 1996]. Par conséquent, chaque agent antimicrobien a un spectre d'activité qui lui est propre (tableau BII.3). Par exemple, le formaldéhyde et ses dérivés agissent en formant des ponts méthylènes entre les acides aminés constitutifs des protéines membranaires, ce qui déstabilise de manière irréversible les membranes et mène à la mort cellulaire [Basset, 1996]. Quant au chlorure de benzalkonium ainsi qu'aux alcools, ils altèrent la membrane des micro-organismes en solubilisant les lipides membranaires [Willey, 2008]. Les acides organiques quant à eux déséquilibrent le gradient osmotique à travers la membrane cytoplasmique [Dunn et Lutz, 2003]. Comme chaque conservateur possède un mécanisme d'action ciblé qui lui est propre, il est souvent utilisé des mélanges de conservateurs afin d'élargir le spectre d'activités. Les mélanges de conservateurs présentent de nombreux avantages comme la possibilité de diminuer la concentration de chaque agent antimicrobien et les éventuels effets secondaires reliés, et augmenter l'efficacité par synergie [Siegert, 2006 ; Woodruff, 1999].

Tableau BII.3. Spectre d'activité de certains agents antimicrobiens couramment utilisés.

Groupe	Bactéries Gram +	Bactéries Gram -	Champignons
Dérivés phénolés	+++	+	+
Ammoniums quaternaires	+	++	-
Chlorhexidine	+++	+++	+
Alcools	+++	+++	+++
Triclosan	+++	++	-

avec : (++++) activité excellente; (++) activité bonne mais n'inclut pas la totalité du spectre microbien; (+) activité suffisante; (-) absence d'activité ou activité insuffisante, adapté à partir de Pittet et Boyce, 2001

4.2.3 Le contexte concernant les conservateurs

Il existe plusieurs types de conservateurs d'origine naturelle ou synthétique. En Europe, l'utilisation de conservateurs est réglementée. Il est possible de citer entre autres la directive 95/2/CE du 20 février 1995 pour l'agro-alimentaire, l'annexe VI de la directive cosmétique Européenne 76/768/CEE pour la cosmétique ainsi que la pharmacopée européenne pour les produits pharmaceutiques. Parmi la liste de conservateurs autorisés, les esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, également connus sous le nom de parabens, sont très utilisés depuis les années 1920 dans les domaines agro-alimentaire, cosmétique ou encore pharmaceutique [Kerdudo, 2014 ; Darbre, 2008]. En effet, les parabens présentent un large spectre d'activité et sont peu chers en plus d'être peu irritants et sensibilisants [Soni et al., 2001]. Cependant en 1997, une étude *in vivo* menée sur de la peau de rat montre que 30% du propylparaben appliqué par voie locale subit un passage transdermique sans être transformé par les enzymes cutanées (carboxyestérases) en acide para-hydrobenzoïque [Bando et al., 1997]. Il en va de même pour 4% de butylparaben [Bando et al., 1997]. En 2002, Oishi, 2002 a démontré des effets toxiques du propylparaben sur la reproduction du rat. S'en suit en 2004 une étude de Darbre et al., 2004 mesurant l'accumulation de parabens dans les tumeurs de cancer du sein. Cette étude a démontré qu'au moins une partie des parabens pouvait traverser les barrières lipidiques de la peau, être retenue et accumulée dans les tissus de l'organisme sans subir d'hydrolyse. Ces travaux ont été controversés de par de nombreux biais techniques et méthodologiques soulevés par les experts et notamment le Comité Scientifique sur les Produits de Consommation de la Commission Européenne en 2005. Après expertise de l'ensemble des études actuellement disponibles, la commission de cosmétologie du 29 septembre 2005 s'est prononcée favorable à la poursuite de l'utilisation, aux conditions prévues par la réglementation actuelle, des éthyl-, méthyl-, propyl- et butylparabens. Néanmoins, ces études ont provoqué de vives réactions au sein des autorités et du grand public. Cela a d'ailleurs conduit l'Assemblée Nationale à adopter en première lecture le 3 mai 2011 une proposition de loi visant à interdire leur usage : « *la fabrication, l'importation, la vente ou l'offre de produit contenant des phtalates, des parabens ou des alkylphénols sont interdites* ». Bien qu'aucune étude scientifiquement fondée n'ait démontré jusqu'à présent un réel danger le principe de précaution est donc appliqué [Aubert et al., 2012]. Il se trouve également que de nombreux agents antimicrobiens qu'ils soient naturels

ou synthétiques ont été mis en cause dans des allergies ou des sensibilisations de contacts lors d'études récentes [Perrenoud et al., 1994; Hong et Bielory, 2009; Bleasel et al., 2002]. Il devient donc important d'étudier les alternatives de conservation permettant de remplacer les parabens et de réaliser une formulation allégée en conservateurs. Ceci permettrait de répondre à la demande grandissante des consommateurs qui rejettent en masse les conservateurs et d'anticiper une législation en perpétuelle évolution restrictive [Varvaresou et al., 2009 ; Gould, 1996].

5 Les alternatives à l'utilisation d'agents antimicrobiens

5.1 Paramètres du conditionnement

La durée de vie du produit est conditionnée par ses nombreuses interactions avec son environnement et peut être améliorée en utilisant des matériaux de conditionnement adaptés. Le choix du conditionnement est d'autant plus important lorsqu'il est souhaité d'optimiser la conservation du produit en diminuant la concentration en agents antimicrobiens.

5.1.1 Le flacon pompe

Le flacon pompe est un conditionnement avantageux contrairement aux récipients ouverts tels que les pots car les embouts de distribution de la formulation offrent une surface moins importante pour la contamination [Varvaresou et al., 2009]. Cependant, l'utilisation de flacon pompe pose l'inconvénient de contaminations environnementales possible lors de la rentrée d'air dans le contenant en compensation du volume de formule restitué.

5.1.2 Les doses unitaires

Parmi les contenants protecteurs, il existe les doses unitaires dites « unidoses ». Elles représentent le système le plus efficace car le produit doit être utilisé en une seule fois dans la plupart des cas ce qui évite les contaminations et croissances de micro-organismes ultérieures [Orth et Kabara, 1998]. Ainsi il est possible de diminuer ou de totalement supprimer la quantité d'agents antimicrobiens présents au sein du produit. L'un des inconvénients majeurs est la quantité de matériaux de conditionnement utilisée qui se trouve être décuplée pour un volume de produit donné par rapport aux multidoses.

5.1.3 Conditionnements airless

Les conditionnements de type airless sont usuellement utilisés afin de protéger le produit des contaminations environnementales [Varvaresou et al., 2009]. Les systèmes airless sont des formules réalisées sans air pour lesquelles la capacité du contenant s'ajuste constamment à la quantité de produit restant. Ils permettent notamment la restitution du produit sans reprise d'air et le contenant déformable ou rigide peut être à piston ou à poche. Ils permettent de réduire considérablement les contaminations mais ne sont pas suffisants pour s'en prémunir totalement. Des solutions complémentaires ont donc été développées. Par exemple l'entreprise Aptar propose la pompe *Irrésistible*, dotée de filtres stérilisants de 0,2 µm et d'un obturateur hermétique. La société Promens a quant à elle commercialisé le système *D.e.f.i.* (Dispositif exclusif formule intacte), une capsule dotée d'un système de fermeture breveté qui permet de conserver une formule stérile absolument intacte. La capsule *D.e.f.i.*, se compose notamment d'une membrane souple qui se soulève lorsqu'il est exercé une pression sur le tube pour revenir en place quand la pression est relâchée. Ces pièces suppriment les espaces libres du conditionnement primaire au niveau de la partie assurant la délivrance du produit. Ceci permet d'assurer une étanchéité totale, limitant ainsi les contaminations secondaires.

5.1.4 Conditionnements antimicrobiens

Les conditionnements antimicrobiens représentent actuellement une nouvelle technologie en plein essor. Ils permettent de réduire le taux de croissance des micro-organismes afin d'augmenter la durée de conservation et de maintenir la qualité du produit ainsi que sa sécurité d'utilisation [Han, 2003].

5.2 Paramètres de la formule

5.2.1 Activité de l'eau

Afin de survivre et de se développer les micro-organismes doivent maintenir un état de turgescence à l'intérieur des cellules, phénomène possible par osmose avec le milieu extracellulaire [Kerdudo, 2014]. Par conséquent, afin d'assurer leur croissance et leur multiplication les micro-organismes doivent être en présence d'eau en quantité suffisante [Enigl et Sorrells, 1997]. La disponibilité de l'eau pour la croissance microbienne est mesurée par l'activité de l'eau a_w qui représente les forces de liaisons entre l'eau et les constituants du produit. L'activité de l'eau correspond à la mesure des molécules d'eau non complexées. Elle est définie par la formule suivante :

$$a_w = \frac{P}{P_0} \quad \text{[BII.1]}$$

avec :

P pression de vapeur de la solution (Pa)

P_0 pression de vapeur de l'eau pure (Pa) mesurées à température constante

Par définition, la pression de vapeur est la pression sous laquelle la formule est en équilibre avec sa vapeur à une température constante.

L'isotherme de sorption entre l'eau et les composés du produit est divisée en trois zones (Labuza et al., 1972 ; figure BII.3) :

- *Zone 1* ($a_w < 0,3$) : correspond à l'eau « fortement liée », dite aussi « de constitution » représentative des poudres et des produits déshydratés. Dans ce cas, l'eau est intimement liée aux composants de la formule par des liaisons hydrogènes et des forces de Van der Waals. Cette eau n'est pas disponible pour la croissance microbienne.
- *Zone 2* (a_w entre 0,3 et 0,7) : correspond à l'eau « faiblement liée », recouvrant partiellement la surface des composants de la formule. Cette eau est peu disponible pour la croissance microbienne
- *Zone 3* ($a_w > 0,7$) : correspond à l'eau « libre » donc chimiquement non liée qui peut être utilisée par les micro-organismes.

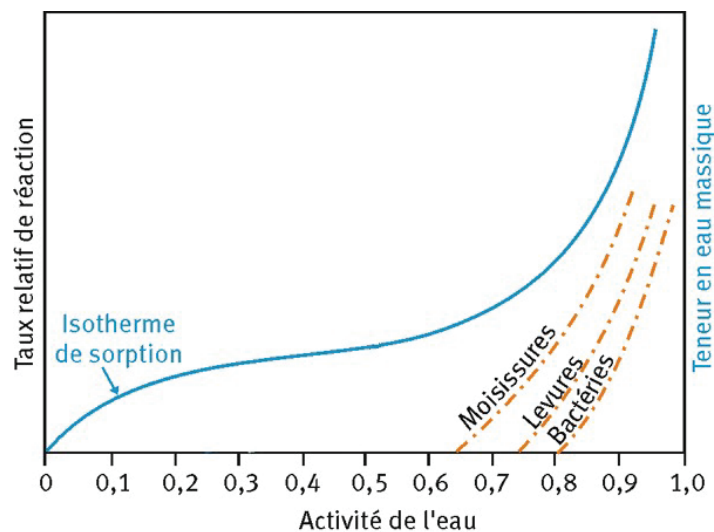


Figure BII.3. Evolution des processus de développement microbiens en fonction de l'activité de l'eau, adapté à partir de [Labuza et al., 1972].

Chen et Shelef, 1992 ont prouvé que le nombre de cellules de *Listeria monocytogenes* dans un système de viande modèle s'élève à 10^9 au bout de 7 jours à 20°C pour une valeur de a_w de 0,994-0,981. Le nombre de cellule bactérienne n'est plus qu'à 10^7 pour une diminution de a_w à 0,965. De plus, pour une activité de l'eau encore inférieure et égale à 0,932 aucune croissance n'est mesurée. Cela démontre donc que les conditions d'hydratation exercent une influence importante sur la physiologie des micro-organismes représentant un facteur majeur dans la

prévention ou la limitation de la croissance microbienne. Plusieurs travaux ont d'ailleurs permis d'affirmer qu'une réduction de a_w entraîne les effets suivants :

- augmentation de la période de latence [Buchanan et al., 1989 Buchanan et Philips, 1990 ; Davey, 1991]
- diminution de la croissance et du taux de production des toxines [Enigl et Sorrells, 1997 ; Briozzo et al., 1983 ; Barbosa-Cánovas et al., 2007 ; Rahman et Labuza, 1999]

Scott, 1953 et Christian, 1963 ont démontré que les micro-organismes ont chacun des niveaux minimums d'activité de l'eau en dessous desquels ils ne se développeront plus (tableau BII.4). Les bactéries sont généralement plus sensibles que les levures et les moisissures puisque presque toutes sont inhibées à une activité de l'eau inférieure à 0,9 [Davidson, 1997]. Chirife, 1993 a notamment démontré qu'une réduction de a_w à 0,92 est suffisante pour supprimer la croissance de bactéries pathogènes à l'exception de *Staphylococcus Aureus* qui prolifère encore à des valeurs de a_w de 0,86. Les moisissures et les levures peuvent quant à elles se développer jusqu'à des valeurs de 0,7-0,8 et 0,87-0,94 respectivement [Aberoumand, 2010]. Les travaux de Rahman et Labuza, 1999 ont permis de démontrer qu'il n'y a généralement aucune prolifération de micro-organismes en dessous de $a_w = 0,62$.

Tableau BII.4. Valeurs des activités de l'eau (a_w) minimales permettant la croissance de certains micro-organismes représentatifs à 25°C [Kerdudo, 2014].

Micro-organisme	a_w minimal
Bactéries	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,97
<i>Escherichia coli</i>	0,95
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
Levures et moisissures	
<i>Aspergillus niger</i>	0,77
<i>Candida albicans</i>	0,87

Il est possible d'ajouter des humectants afin de diminuer la valeur de l'activité de l'eau tels que le chlorure de sodium, l'éthanol, le lactate de sodium, le propylène glycol, le glycérol ainsi que le glucose (figure BII.4) [Briozzo et al., 1983 ; Robinson et al., 1998]. Les fonctions hydroxyles des humectants permettent la formation de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau résultant en une réduction de l' a_w [Kerdudo, 2014]. L'étude de Briozzo et al., 1983 démontre d'ailleurs que la croissance de *Clostridium botulinum* est inhibée par une diminution de la valeur de l'activité de l'eau de 0,972 à 0,949 grâce à l'ajout de chlorure de sodium. Les sels inorganiques ainsi que les hydrocolloïdes utilisés pour augmenter la viscosité des formulations abaissent également la valeur de l' a_w en formant un réseau tridimensionnel qui limite la mobilité des molécules d'eau dans le milieu [Doherty et Ward, 1997 ; Mazurkiewicz et al., 2001 ; Kerdudo, 2014].

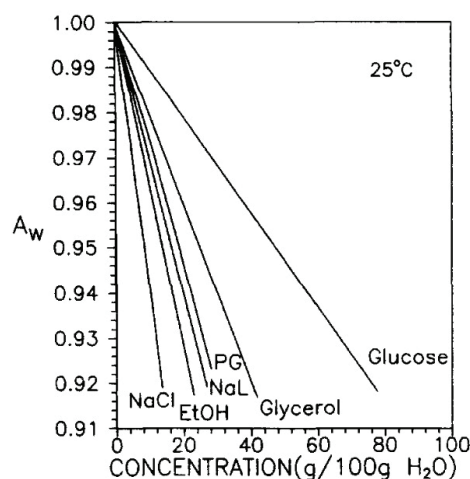


Figure BII.4. Effet de la concentration de divers humectants sur l'activité de l'eau (a_w) avec PG : propylène glycol ; EtOH : éthanol ; NaL : lactate de sodium ; NaCl : chlorure de sodium [Chirife et Favetto, 1992].

Il est important de prendre en considération que la diminution de la valeur de l'activité de l'eau d'une formulation protège contre le développement des micro-organismes mais ne permet pas la destruction d'une population contaminante déjà présente, comme peuvent le faire des conservateurs microbicides.

5.2.2 pH

Le fonctionnement cellulaire microbien nécessite le maintien d'un pH intracellulaire approprié. Ainsi, plus le pH du milieu externe dans lequel se trouvent les cellules s'éloigne de cette valeur optimale de croissance, plus les micro-organismes sont dans des conditions de stress défavorables à tout développement [Kerdudo, 2014]. Briozzo et al., 1986 a notamment démontré que pour une diminution du pH de 6,9 à 6,5 il est observé une augmentation du temps de latence de croissance de *Clostridium botulinum* de 8 à 27 jours. Pour chaque micro-organisme, il existe une valeur de pH optimal de croissance (tableau BII.5). En général, les bactéries se développent davantage dans des milieux ayant un pH compris entre 4,5 et 9 les levures connaissent un pH optimum de croissance entre 2 et 9 et les moisissures se développent pour des pH allant de 1,5 à 11 [Orth et Kabara, 1998]. La plupart des bactéries se développent donc à un pH neutre ou proche de la neutralité, contrairement aux levures et moisissures pour lesquelles un pH acide semble davantage approprié.

Tableau BII.5. Valeur du pH minimum, optimal et maximum de croissance pour différents micro-organismes, d'après Bourgeois et al., 1996.

Micro-organisme	mini	optimal	maxi
Bactéries			
Pseudomonas	5,6	7	8
Salmonella spp	4,5	7	8-9
Listeria monocytogenes	4,3	6,5-7,5	9,5
Staphylococcus aureus	4,2	7-7,5	9,8
Levures			
	2-3,5	4-6,5	8-8,5
Moisissures			
	1,5-3,5	4,5-6,8	8-11

Il existe de nombreux acides utilisés pour modifier le pH des formules. Les acides forts, de type acide chlorhydrique, font varier uniquement le pH externe des cellules microbiennes alors que les acides faibles, plus hydrophobes, sont capables de traverser la membrane cellulaire et d'agir sur le pH cytoplasmique. Il a été prouvé que lorsque le pH diminue, l'efficacité antimicrobienne des acides organiques faibles tels que l'acide acétique, l'acide ascorbique, l'acide propionique ou encore l'acide benzoïque est augmentée [Chirife, 1993 ; Gould, 1996]. En effet, c'est la solubilité lipidique de leur forme non dissociée qui leur permet de traverser la membrane microbienne et d'être antimicrobiens en modifiant le pH cytoplasmique. En entrant à l'intérieur des cellules, l'acide non dissocié tend à se dissocier car les micro-organismes maintiennent généralement un pH intracellulaire supérieur à leur environnement. Cette dissociation provoque la libération d'ions hydrogènes additionnels qui induisent une diminution du pH ce qui ralentit le métabolisme des micro-organismes qui ne seront plus à leur pH optimums d'activité [Booth, 1985; Booth et Kroll, 1989]. Ainsi, c'est la proportion de la forme non dissociée qui assure l'activité antimicrobienne et elle est contrôlée par la valeur du pH et de la constante de dissociation [Eklund, 1983 et 1985 ; Pethybridge et al., 1983]. La relation entre la fraction non dissociée et le pH est la suivante :

$$[\text{espèce non dissociée}] = \frac{1}{10^{pH-pK} + 1} \quad \text{[BII.2]}$$

La figure BII.5, extraite des travaux de Chirife et Favetto, 1992, démontre qu'une diminution de pH de 6 à 5 augmente le pourcentage de forme non dissociée pour divers acides organiques faibles que sont l'acide benzoïque, sorbique et propionique. Par exemple, pour l'antimicrobien qu'est l'acide sorbique ($pK_a=4,75$) une diminution du pH de 6 à 5,7 double presque la concentration en espèce non dissociée qui est la plus active contre les micro-organismes [Chirife, 1993]. Torres et Karel, 1985 ont démontré que l'efficacité de l'acide sorbique est 2,5 fois plus importante pour une diminution de pH de 6,4 à 6,1. La valeur de pK_a des acides faibles communément utilisés pour la protection microbienne s'étend de 4,2 pour l'acide benzoïque à 4,87 pour l'acide propionique. Par conséquent à des valeurs de pH très au-dessus de ces valeurs l'activité antimicrobienne se trouve être fortement réduite [Gould, 1996].

Il est important de noter que d'autres conservateurs, dont certains tensioactifs cationiques sont actifs seulement sous leur forme ionisée (*cf Etude bibliographique – Partie 2 – section 6.2.2 Les tensioactifs*). C'est le cas par exemple pour les ammoniums quaternaires, actifs à pH alcalin qui perdent progressivement leur activité avec la diminution du pH [Mussard, 2006].

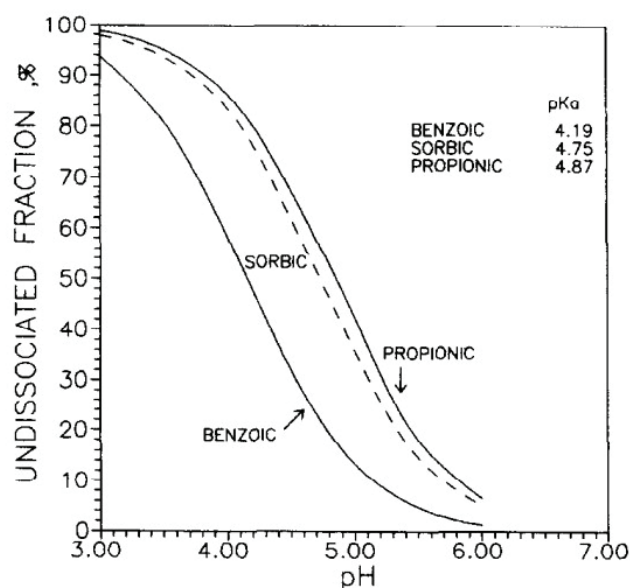


Figure BII.5. Effet du pH sur la dissociation de plusieurs acides faibles que sont les acides benzoïque, sorbique et propionique [Chirife et Favetto, 1992].

5.2.3 Les tensioactifs

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles utilisées afin d'abaisser les tensions superficielles d'une dispersion entre deux milieux immiscibles. Plusieurs classes de tensioactifs existent et, en fonction de leur nature et de leur charge, il est possible de distinguer les tensioactifs anioniques, cationiques, non-ioniques et amphotères. En plus de leur action de dispersion, les tensioactifs possèdent une activité antimicrobienne. En effet, de par leurs structures, des interactions entre les tensioactifs et les cellules des micro-organismes peuvent s'établir grâce à des interactions électrostatiques ou encore des effets hydrophobes [Patrone et al., 2010]. Les tensioactifs sont capables d'interagir avec plusieurs composants cellulaires, en particulier les protéines et les lipides, causant ainsi des effets délétères sur la croissance et la viabilité des cellules microbiennes [Merianos, 1991 ; Hugo et Russel, 1992].

➤ Les tensioactifs cationiques et amphotères

Il a été démontré que les tensioactifs cationiques, tels que les sels d'ammonium quaternaires sont bactéricides, notamment sur les bactéries Gram + [Bodor et al., 1980 ; Shao et al., 2003 ; Jia et al., 2001 ; Son et Sun, 2003 ; Merianos, 1991]. En effet, cette classe de molécules altère la perméabilité des membranes cellulaires bactériennes ce qui a pour conséquence de diminuer

leur activité et de mener à leur mort [Chapman et al., 1993]. Les tensioactifs amphotères possèdent des propriétés bactéricides notables puisqu'ils se comportent comme des tensioactifs cationiques aux pH de la plupart des formulations. Cependant leur action est inférieure à celle des sels d'ammonium quaternaire [Kerdudo, 2014].

➤ Les tensioactifs anionique

Concernant les tensioactifs anioniques tels que les sels d'acides gras, ils possèdent une action détergente importante mais des propriétés antimicrobiennes faibles excepté lorsqu'ils sont introduits à une concentration supérieure à leur concentration micellaire critique où ils induisent la désintégration des membranes des bactéries notamment à Gram + [Hugo et Russell, 1992 ; Gaibraith et al., 1971, Bayliss, 1936 ; Ingram, 1981].

➤ Les tensioactifs non-ioniques

Les tensioactifs non-ioniques sont généralement utilisés en tant qu'agents solubilisants et leur potentiel antimicrobien dépend de leur concentration. En dessous de leur concentration micellaire critique ils peuvent exercer une action antimicrobienne, cependant au-delà de la concentration micellaire critique ils risquent d'inhiber l'activité des agents antimicrobiens (cf *sous chapitre 6.2.2 Les tensioactifs*).

5.2.4 Combinaisons de technologies

Il est possible d'associer plusieurs techniques de conservation afin d'obtenir une préservation optimale du produit [Leistner, 2000 ; Chirife, 1993]. Briozzo et al., 1986 ont notamment prouvé que la combinaison d'une diminution de l'activité de l'eau et du pH sont des éléments clés pour la conservation des produits (figure BII.6). Presser et al., 1997 ont notamment prouvé que lorsque l'activité de l'eau diminue de 0,985 à 0,955, le pH de croissance des micro-organisme augmente de 4,8 à 6,8 à 10°C. En utilisant une combinaison de plusieurs paramètres, certaines formulations peuvent donc posséder une auto-protection suffisante et ne pas nécessiter l'ajout de conservateur.

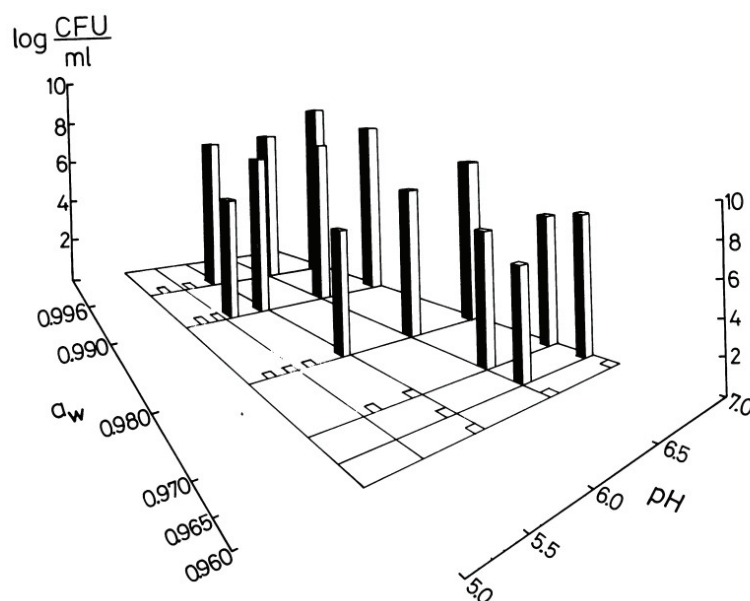


Figure BII.6. Effet combiné de l'activité de l'eau (a_w) et du pH sur la croissance de *Clostridium botulinum* de type G incubé à 32°C [Briozzo et al., 1986].

6 Les facteurs influençant l'efficacité des agents antimicrobiens dans les formulations

6.1 L'inactivation des agents antimicrobiens par les composés de la formule

6.1.1 Coefficient de partage huile/eau

La concentration de l'agent antimicrobien dans l'eau détermine son efficacité puisque les micro-organismes se multiplient en phase aqueuse [Bean et al., 1965 ; Kazmi et Mitchell, 1978]. Sabalitschka et Priem, 1939 ont notamment démontré qu'une solution de 10% de phénol dans l'huile tue la famille de micro-organismes *Staphylococci* en 7 heures. En mélangeant cette solution avec 2% d'eau, le même micro-organisme est tué en 50 minutes. Dans les mêmes conditions, une solution aqueuse de 2% de phénol tue le micro-organisme en 5 minutes. Il a donc été prouvé que le phénol dissout dans l'huile en l'absence d'eau est 20 fois moins efficace, et en présence de traces d'eau 10 fois moins efficace qu'une solution aqueuse de phénol. Par conséquent, il est important que l'agent antimicrobien soit maintenu à une concentration efficace dans la phase aqueuse du produit.

En présence d'eau et d'huile, l'agent antimicrobien se séparera dans chacune des deux phases en fonction de son affinité. Le coefficient de partage huile/eau caractérise cette séparation et est égal au rapport des concentrations du soluté dans les deux phases en présence :

$$K_{o/w} = \frac{[\text{antimicrobien}]_{\text{huile}}}{[\text{antimicrobien}]_{\text{eau}}} \quad [\text{BII.3}]$$

Si $K_{o/w} < 1$, le conservateur aura un caractère hydrophile marqué et au contraire, si $K_{o/w} > 1$ le conservateur aura un caractère hydrophobe marqué.

Le coefficient de partage huile/eau est un facteur important qui influence l'activité des conservateurs dans un système tel qu'une dispersion simple huile dans eau ou une émulsion. En effet, le coefficient de partage huile/eau contrôle la disponibilité du conservateur dans la phase aqueuse. Les formulations utilisant des huiles induisant un fort coefficient de partage sont donc plus difficiles à protéger. Pour des agents antimicrobiens plus solubles dans l'huile que dans l'eau une quantité suffisante doit être ajoutée à un système huile/eau afin d'obtenir une concentration active dans la phase aqueuse [Bean et al., 1965]. Une table de coefficient de partage a été réalisée par Hibbott et Monks, 1961 pour le méthylparaben dans plusieurs huiles communément utilisées mais peu de tables de ce genre existent dans la littérature.

Le ratio huile/eau est également un paramètre important à prendre en compte puisque le coefficient de partage en dépend [Bean et al., 1965]. Lorsque les coefficients de partage sont inférieurs à 1, la majorité du conservateur se retrouve dans la phase aqueuse et une augmentation du ratio huile/eau augmente la concentration en phase aqueuse. Cependant, lorsque le coefficient de partage est plus grand que 1, la majeure quantité de l'agent antimicrobien est dans la phase huileuse et une augmentation du ratio huile/eau diminue la concentration au sein de la phase aqueuse. De ce fait, lors de la sélection d'un agent antimicrobien pour une formulation, le coefficient de partage ainsi que la proportion d'huile dans le produit doivent être pris en considération.

Il est à noter que pour augmenter l'efficacité des parabens il est possible d'ajouter des agents solubilisants ou co-solvants, comme le propylène glycol. Darwish et Bloomfield, 1995 ont notamment démontré l'augmentation de la solubilité du méthylparaben qui double en phase aqueuse grâce à l'ajout d'un co-solvant tel que l'éthanol aboutissant à une augmentation de l'activité antimicrobienne.

6.1.2 Les tensioactifs

Les études ont démontré que l'activité antimicrobienne est largement fonction de la concentration en agent antimicrobien libre et que les conservateurs associés avec les micelles de tensioactifs n'ont que peu ou pas d'activité [Mukerjee, 1971 ; Kazmi et Mitchell, 1978 ; Pisano et Kostenbauder, 1959]. Or, lorsque les tensioactifs sont introduits à une concentration supérieure à la concentration micellaire critique une fraction d'agents antimicrobiens présents en solution peut interagir avec les micelles de tensioactif ou bien être solubilisée au sein même de ces micelles. A ce sujet, de nombreux travaux mesurent une inactivation de l'activité antimicrobienne des conservateurs phénoliques par des tensioactifs non ioniques dérivés d'esters d'acides gras [De Navarre et Bailey, 1956 ; Barr et Tice, 1957]. Bhargava et Leonard, 1996 ont par exemple démontré qu'en présence de polysorbate 80, l'activité du triclosan est

limitée de par une solubilisation du conservateur au sein des micelles. De même, le phénoxyéthanol démontre une activité réduite en présence de polysorbate 80 [Fraise et al., 2008].

➤ Le cas des parabens avec le polysorbate 80

Un des exemples les plus étudiés est l'inactivation des conservateurs parabens par le polysorbate 80 [Aoki et al., 1957 ; Bean et al., 1965 ; De Navarre et Bailey, 1956 ; Barr et Tice, 1957]. En effet, Pisano et Kostenbauder, 1959 ont démontré que la concentration minimale inhibitrice (CMI) en méthylparaben nécessaire pour inhiber la croissance d'*Aerobacter aerogenes* passe de 0,075% à 0,32% pour une concentration en polysorbate 80 allant de 0% à 7% respectivement. Ashworth et Heard, 1966 ont également mesuré qu'à des concentrations en polysorbate 80 de 1,43% et 2,86% les fractions de méthylparaben sous forme libre passent de 2,9% à 1,9% respectivement. Patel et Kostenbauder, 1958 ont également quantifié qu'à une concentration de 5% en polysorbate 80 seulement 22% de la quantité totale de méthylparaben et 4,5% du total de propylparaben sont présents sous forme libre. La quantité d'agent antimicrobien disponible sous forme libre diminue donc avec l'augmentation de la concentration en tensioactif (figure BII.7). La forme libre étant la forme microbiologiquement active, des augmentations significatives des concentrations en conservateurs phénoliques sont nécessaires afin d'inhiber la croissance des micro-organismes en présence de polysorbate 80 notamment [Patel et Kostenbauder, 1958 ; Kostenbauder, 1983].

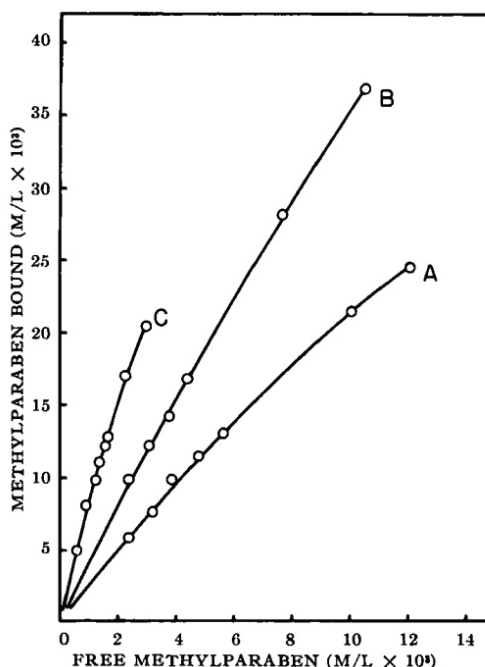


Figure BII.7. Représentation de la quantité de méthylparaben libre par rapport à celle non libre en fonction de la concentration en polysorbate 80. A. : 3% en polysorbate 80 ; B. 5% en polysorbate 80 ; C. 10% en polysorbate 80 [Patel et Kostenbauder, 1958].

➤ Calcul de la fraction en agent antimicrobien libre

Il a été prouvé que quelle que soit la concentration en polysorbate 80, le rapport de la fraction en conservateur libre par rapport à la quantité totale introduite est une constante (figure BII.8 ; Patel et Kostenbauder, 1958 ; Bahal et Kostenbauder ; 1964). Ceci est intéressant pour calculer la fraction de conservateur nécessaire pour assurer la protection de la formulation grâce à l'équation suivante :

$$R \times [\text{conservateur libre nécessaire}] = [\text{conservateur requis dans la formule}] \quad [\text{BII.4}]$$

$$\text{avec } R = \frac{[\text{conservateur total}]}{[\text{conservateur libre}]} \quad [\text{BII.5}]$$

Par exemple, la valeur de R pour le méthylparaben en présence de 5% de polysorbate 80 est de 4 [Blaug et Ashan, 1961]. Ceci indique que si la concentration de conservateur libre nécessaire pour limiter la croissance des micro-organismes est de 100mg/mL en l'absence de polysorbate 80, cette valeur s'élèverait à 400mg/mL en présence de 5% de polysorbate 80 [Blaug et Ashan, 1961].

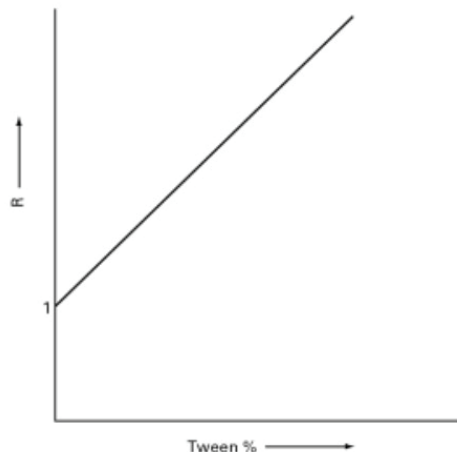


Figure BII.8. Représentation du rapport de la quantité en agent antimicrobien totale/libre noté R, en fonction de la concentration en polysorbate 80. [Hugo et Russell, 1992].

6.1.3 Les autres excipients

Les études concernant l'activité des conservateurs en présence de macromolécules sans propriétés de surface sont variées et non exhaustives. Il a notamment été démontré que la complexation entre les conservateurs et certains excipients affecte l'activité antimicrobienne du conservateur. Par exemple, l'interaction entre les conservateurs parabens et le bêta-

cyclodextrine a été démontrée être dépendante de la concentration en bêta-cyclodextrine et de la nature du conservateur étudié [Chan et al., 2000 ; Lehner et al., 1993]. En effet, pour le méthylparaben par exemple la quantité de conservateur total par rapport à la fraction libre (facteur R décrit précédemment en section 6.2.2 *Les tensioactifs*) est de 1,68 ; 2,20 et 3,66% pour 0,25 ; 0,50 ; et 0,75% de bêta-cyclodextrine respectivement [Chan et al., 2000]. Il a donc clairement été démontré que le degré d'interaction avec le conservateur augmente avec la concentration en bêta-cyclodextrine, impactant la capacité de préservation de l'agent antimicrobien. De plus, il a été prouvé que la fraction de conservateur total par rapport à la fraction libre varie également avec le type d'agent antimicrobien étudié et se trouve être augmentée selon l'ordre suivant méthylparaben < éthylparaben < propylparaben < butylparaben [Chan et al., 2000]. Il a été supposé que la forme et la taille ainsi que le degré d'hydrophobicité des groupes alkyls peuvent affecter l'intensité de l'interaction. Kurup et al., 1991 ont également démontré que l'activité antimicrobienne du méthylparaben contre *Pseudomonas aeruginosa* est affectée par la présence de plusieurs excipients tels que la gomme de guar ou la gomme adragante. Ces dernières interagissent avec l'agent antimicrobien par des liaisons hydrophobes et réduisant ainsi la disponibilité du conservateur et donc son activité antimicrobienne. Les interactions entre les dérivés celluloses et les conservateurs de type parabens ont également été étudiées [Kurup et al., 1995]. Pour des concentrations inférieures à 0,5% en dérivés celluloses il a été mesuré une faible variation de l'activité antimicrobienne du méthylparaben. Cependant au-delà de 0,5%, l'ordre d'inactivation du méthylparaben est le suivant : hydroxypropylméthylcellulose > carboxyméthylcellulose > méthylcellulose. Il a été prouvé que l'ordre d'intensité d'interaction du méthylparaben avec ces trois dérivées celluloses suit également une tendance similaire démontrant que l'interaction chimique joue un rôle déterminant dans la réduction de l'activité des conservateurs.

6.2 L'inactivation des agents antimicrobiens par les composés du conditionnement

La nature chimique du conditionnement primaire est à considérer avec attention par rapport à la formule conditionnée. En effet, certains polymères synthétiques, comme le polyéthylène notamment, peuvent adsorber de nombreux composants du produit conditionné et en particulier les conservateurs [Youssef et al., 1973]. De plus, certains plastifiants tels que les phtalates d'alkyles présents en grande quantité dans le chlorure de polyvinyle souple migrent lentement du conditionnement primaire vers la formule et peuvent inactiver les conservateurs phénoliques [Monroy, 1993 ; Amara et al., 2013]. L'alcool benzylique qui est un agent antimicrobien peut également interagir avec le polyéthylène et le polystyrène [Cooper, 1974].

6.3 Effets synergiques

Chaque agent antimicrobien ayant son spectre d'activité qui lui est propre, l'utilisation de plusieurs composés antimicrobiens permet d'obtenir une sécurité microbienne tout en diminuant les concentrations de chaque composé dans le produit. Dans certains cas, il est

observé un effet synergique entre les différents agents antimicrobiens mis en présence c'est-à-dire que le mélange permet une activité antimicrobienne supérieure à chaque conservateur pris séparément. Orth et al., 1989 détermine qu'il y a une synergie antimicrobienne lorsque la pente du taux de décroissance des microorganismes est un nombre négatif supérieur par rapport à la somme des deux pentes de chaque conservateur. Les travaux de Zapico et al., 1998 ont démontré que l'addition de nisine dans du lait écrémé ne démontre aucune inhibition sur *Listeria monocytogenes* tandis que l'addition de lactoperoxydase résulte en une décroissance de 3 unités de log après 24h. Il a été mesuré un effet synergique lorsque la nisine et le lactoperoxydase sont ajoutés dans le même milieu résultant en une décroissance de 5.6 unités de log après 24h. Patrone et al., 2010 ont quant à eux démontré l'effet synergique des huiles essentielles d'eucalyptus et de menthe, utilisés comme parfum dans l'industrie cosmétique, avec le méthylparaben pour inhiber la croissance de *Pseudomonas Aeruginosa*. Il a également été mesuré que les huiles aromatiques pour l'agroalimentaire telles que les huiles de menthe ou d'anis démontrent un effet inhibiteur synergique à pH peu élevé et en présence de chlorure de sodium contre *Listeria monocytogenes* et *Lactobacillus curvatus* [Tassou et al., 1995 ; Lachowicz et al., 1998]. Ettayebi et al., 2000 ont quant à eux démontré une synergie entre le thymol et la nisine concernant l'inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis* (figure BII.9). Pol et Smid., 1999 ont mesuré que la combinaison de nisine avec du carvacrol résulte en une augmentation de la réduction des cellules de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus* indiquant une synergie entre les deux agents antimicrobiens. L'action synergique de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) sur les parabens a également largement été rapportée [Kabara, 1996 ; Geis, 2006 ; Mussard, 2006]. Orth et al., 1989 ont par exemple démontré une activité 6 fois plus importante sur l'inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* pour le mélange EDTA et méthylparaben comparé à l'activité de chaque molécule étudiée séparément. L'amélioration de l'activité des conservateurs en présence d'EDTA a été rapportée être reliée à la synergie de perméabilisation dans laquelle l'EDTA assiste le passage de l'autre agent antimicrobien au travers de la paroi cellulaire ou de la membrane [Denyet et al., 1985].

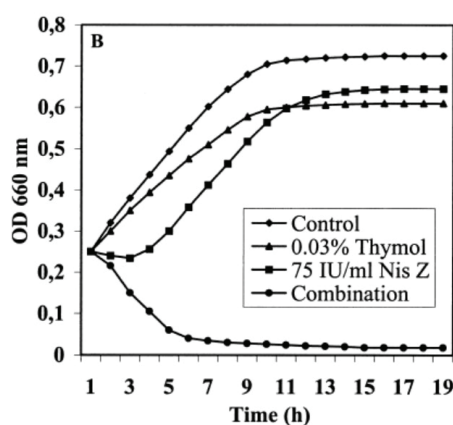


Figure BII.9. Effet combiné de la nisine et du thymol sur la croissance cellulaire de *Bacillus subtilis* avec OD : densité optique à 660nm [Ettayebi et al., 2000].

La valeur de la densité optique est représentative de la densité de cellules microbiennes.

Conclusion

L'activité antimicrobienne d'un conservateur est fonction de nombreux paramètres tant de la formulation que du conditionnement primaire. La liste des facteurs influençant l'activité des agents antimicrobiens n'est pas exhaustive et chaque formulation devra être étudiée et testée microbiologiquement. Certaines formulations peuvent posséder une autoprotection suffisante et ne pas nécessiter l'ajout d'un conservateur ou seulement en très faible quantité. Cette autoprotection peut être la conséquence :

- Des caractéristiques physico-chimiques de la formulation (pH bas, quantité d'eau libre faible ou inexistante) ;
- De la présence d'additifs non listés en tant que conservateurs mais possédant des propriétés antimicrobiennes et introduits dans la formulation pour assurer une autre fonction que la conservation, c'est par exemple le cas des tensioactifs
- Du conditionnement primaire qui peut être protecteur en évitant un retour d'air contaminé au sein de la formule par exemple

Références

- [Aberoumand, 2010] Aberoumand A., 2010. The effect of water activity on preservation quality of fish, a review article, *World J. Fish Mar. Sci.*, 2, 221–225.
- [Amara et al., 2013] Amara A., Zeddami, C., Belhaneche-Bensemra N., 2013. Specific migration of IRGASTAB 17 MOK and DBP from rigid and plasticized poly(vinyl chloride) into organic liquids. *MATEC Web of Conferences*, vol. 3, p.01029. EDP Sciences.
- [Aoki et al., 1957] Aoki M., Kamada A., Matsumoto M., Hasegawa K., Isa Y., 1957. Application of surface active agents to pharmaceutical preparation. III. The influence of non-ionic surface on the activity of sparingly water-soluble fungicides. *Yakugaku zasshi*, 77, 1071–1075.
- [Ashworth et Heard, 1966] Ashworth R.W., Heard D.D., 1966. The evaluation of a molecular sieve technique to determine the interaction between a preservative and a surfactant. *J. Pharm. Pharmacol.*, 18, 98S–102S.
- [Aubert et al., 2012] Aubert N., Ameller T., Legrand J.J., 2012. Systemic exposure to parabens: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 445–454.
- [Backer et al., 2007] Baker S., Nicklin J., Khan N., 2007. *Microbiology*, Ed. revue de: Microbiology / J. Nicklin, K. Graeme-Cook and R. Killington. 2nd ed. 2002, Taylor & Francis Group, New York.
- [Bahal et Kostenbauder, 1964] Bahal C.K., Kostenbauder H.B., 1964. Interaction of preservatives with macromolecules V binding of chlorobutanol, benzyl alcohol, and phenylethyl alcohol by nonionic agents. *J. Pharm. Sci.*, 53, 1027–1029.
- [Bando et al., 1997] Bando H., Mohri S., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M., 1997. Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *J. Pharm. Sci.*, 86, 759–761.
- [Barbosa-Cánovas et al., 2007] Barbosa-Cánovas G.V., Fontana A.J., Schmidt S.J., Theodore P., 2007, *Water Activity in Foods — Fundamentals and Applications*, Blackwell Pub., Ames, Iowa.
- [Barr et Tice, 1957] Barr M., Tice L.F., 1957. The preservation of aqueous preparations containing nonionic surfactants II. Preservative studies in solutions and products containing nonionic surfactants. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 46, 445–451.
- [Basset, 1996] Basset F., 1996. Quel futur pour les produits aromatiques de synthèse?, *Parfums cosmétiques actualités*, 130, 49–54.
- [Bayliss, 1936] Bayliss M., 1936. Effect of the chemical constitution of soaps upon their germicidal properties. *J. Bacteriol.*, 31, 489–504.
- [Bean et al., 1965] Bean H.S., Heman-Ackah S.M., Thomas J., 1965. The activity of antibacterials in two phase systems. *J. Soc. Cosmet. Chem*, 16, 15–30.

- [Beveridge, 2001] Beveridge T.J., 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech. Histochem.*, 76, 111–118.
- [Bhargava et Leonard, 1996] Bhargava H.N., Leonard P.A., 1996. Triclosan: applications and safety. *Am. J. Infect. Control*, 24, 209–218.
- [Blaug et Ashan, 1961] Blaug S.M., Ashan S.S., 1961. Interaction of parabens with nonionic macromolecules. *J. Pharm. Sci.*, 50, 441–443.
- [Bleasel et al., 2002] Bleasel N., Tate B., Rademaker M., 2002. Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. *Austral. J. Dermatol.*, 43, 211–213.
- [Block, 2001] Block S.S., 2001. Disinfection, sterilization, and preservation. Lippincott Williams & Wilkins.
- [Bodor et al., 1980] Bodor N., Kaminski J.J., Selk S., 1980. Soft drugs. I. Labile quaternary ammonium salts as soft antimicrobials, *J. Med. Chem.*, 23, 469–474.
- [Booth et Kroll, 1989] Booth R., Kroll R.G., 1989. The preservation of foods by low pH. *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. G.W. Gould, Elsevier, London, 119–160.
- [Booth, 1985] Booth R., 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbial. Rev.*, 49, 359–378.
- [Bourgeois et al., 1996] Bourgeois C.M., Mescle J.F., Jucca J., *Microbiologie alimentaire, Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Lavoisier Tech et Doc. France, 1996.
- [Briozzo et al., 1983] Briozzo J., de Lagarde E.A., Chirife J., Parada J.L., 1983. Clostridium botulinum Type A growth and toxin production in media and process cheese spread. *Appl. Environ. Microb.*, 45, 1150–1152.
- [Briozzo et al., 1986] Briozzo J., de Lagarde E.A., Chirife J., Parada J.L., 1986. Effect of water activity and pH on growth and toxin production by Clostridium botulinum type G, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 844–848.
- [Buchanan et al., 1989] Buchanan R.L., Stahl H.G., Whiting R.C., 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of Listeria monocytogenes, *J. Food Prot.*, 52, 844–851.
- [Buchanan et Philips, 1990] Buchanan R.L., Philips J.G., 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of Listeria monocytogenes, *J. Food Prot.*, 53, 370–376.
- [Chan et al., 2000] Chan L.W., Kurup T.R.R., Muthaiah A., Thenmozhiyal J.C., 2000. Interaction of p-hydroxybenzoic esters with beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, 195, 71–79.
- [Chapman et al., 1993] Chapman J.S., Diehi M.A., Lyman R.C., 1993. Biocide susceptibility and intracellular glutathione in Escherichia coli. *J. Med. Microbiol.*, 12, 403–407.

- [Chen et al., 1992] Chen N., Shelef L., 1992. Relationship between water activity, salts of lactic acid and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system, *J. Food Prot.*, 55, 574–578.
- [Chirife et Favetto, 1992] Chirife J., Favetto G.J., 1992. Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods, *Food Res. Int.*, 25, 389–396.
- [Chirife, 1993] Chirife J., 1993. Physicochemical aspects of food preservation by combined factors, *Food Control*, 4, 210–215.
- [Christian, 1963] Christian J.H.B., 1963. Water activity and the growth of microorganisms, *Recent Advances in Food Research* *Recent Adv. Food. Res.*, 3, 248–255.
- [Cooper, 1974] Cooper J.R., 1974. Récipients en matière plastique pour les préparations pharmaceutiques: essai et contrôle.
- [Darbre et al., 2004] Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J., Pope G.S., 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.*, 24, 5–13.
- [Darbre, 2008] Darbre P., 2008. The Paraben Debate.
- [Darwish et Bloomfield, 1995] Darwish R.M., Bloomfield S.F., 1995. The effect of co-solvents on the antibacterial activity of paraben preservatives. *Int. J. Pharm.*, 119, 183–192.
- [Davey, 1991] Davey K.R., 1991. Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth, *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 253–257.
- [Davidson, 1997] Davidson P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, M.P Doyle, L.R Beuchat, T.J Montville (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, ASM, Washington, 520–556.
- [De Navarre et Bailey, 1956] De Navarre M.G, Bailey H.E, 1956. Interference of nonionic emulsifiers with preservatives II, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 7, 427.
- [Denyet et al., 1985] Denyet S.P., Hugo W.B., Harding V.D., 1985. Synergy in preservative combinations, *Int. J. Pharm.*, 25, 245–253.
- [Doherty et Ward, 1997] Doherty C.A., Ward P.C., 1997. U.S. Patent No. 5,607,716. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [Dunn et Lutz, 2003] Dunn K., Lutz P., 2003. Finding the balance. *SPC. Soap, perfumery and cosmetics*, 76, 43–46.
- [Eklund, 1983] Eklund R., 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.*, 54, 383–389.
- [Eklund, 1985] Eklund R., 1985. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. *Int. J. Food Microbial.*, 2, 159–167.

- [Enigl et Sorrells, 1997] Enigl D.C., Sorrells K.M., 1997. Water activity and self-preserving formulas. Kabara JJ, Orth DS, editors. *Cosmetics and drug preservation, principles and practice*. New York: Marcel Dekker, 45–73.
- [Ettayebi et al., 2000] Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B.D., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 183, 191–195.
- [Fraise et al., 2008] Fraise A.P., Lambert P.A., Maillard J.Y., 2008. Russell, Hugo & Ayliffe's *Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*. John Wiley & Sons.
- [Gaibraith et al., 1971] Gaibraith H., Miller T.B., Paton A.M., Thompson J.K., 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 808–813.
- [Geis, 2006] Geis P.A., 2006. Preservation strategies. Geis PA editor. *Cosmetic microbiology* 2nd ed., Taylor & Francis Group, New York, 163–180.
- [Gopal et al., 1988] Gopal N.G.S., Patel K.M., Sharma G., Bhalla H.L., Wills P.A., & Hilmy N., 1988. Guide for radiation sterilization of pharmaceuticals and decontamination of raw materials. *Int. J. Radiat. Appl. Instru. Part C. Rad. Phys. Chem.*, 32, 619–622.
- [Gould, 1996] Gould G.W., 1996. Methods for preservation and extension of shelf life, *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 51–64.
- [Han, 2003] Han J.H., 2003. Antimicrobial food packaging. *Novel Food Pack Tech.*, 50-70.
- [Hibbott et Monks, 1961] Hibbott H.W., Monks J., 1961. Preservation of emulsions-p-hydroxybenzoic ester partition coefficient. *J Cosmet. Sci.*, 12, 2–10.
- [Hong et Bielory, 2009] Hong J., Bielory L., 2009. Allergy to ophthalmic preservatives. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 9, 447–453.
- [Hugo et Russell, 1992] Hugo W.B., Russell A.D., 1992. Types of antimicrobial agents. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 2nd ed. Russell, A.D., Hugo, W.B. and Ayliffe, G.A.J. p. 34–38. Oxford: Blackwell Science Publications.
- [Ingram, 1981] Ingram L.O., 1981. Mechanism of lysis of *Escherichia coli* by ethanol and other chaotropic agents. *J. Bacteriol.*, 146, 331–336.
- [Jia et al., 2001] Jia Z.S., Shen D.F., Xu W.L., 2001. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan, *Carbohydr. Res.*, 333, 1–6.
- [Kabara, 1996] Kabara J.J., 1996. Chelating agents as preservative potentiators. *Preservative-Free and Self Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*, Ed. Marcel Dekker, New York, 209–226.
- [Kazmi et Mitchell, 1978] Kazmi S.J.A., Mitchell A.G., 1978. Preservation of solubilized and emulsified systems I: Correlation of mathematically predicted preservative availability with antimicrobial activity. *J. Pharm. Sci.*, 67, 1260–1266.

- [Kerdudo, 2014] Kerdudo A., 2014. Optimisation de la conservation des cosmétiques: impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation. Thèse de Doctorat, Nice.
- [Klis, 1994] Klis F.M., 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast*, 10, 851–869.
- [Kostenbauder, 1983] Kostenbauder H.B., Physical factors influencing the activity of antimicrobial agents, 1983. SS Block (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation* (3rd ed), Lea & Febiger, Philadelphia, 811–828.
- [Kurup et al., 1991] Kurup T.R., Wan L.S., Chan L.W., 1991. Interaction of preservatives with macromolecules: Part I. Natural hydrocolloids. *Pharm. Acta Helv.*, 67, 301–307.
- [Kurup et al., 1995] Kurup T.R.R., Wan L.S., Chan L.W., 1995. Interaction of preservatives with macromolecules. Part II. Cellulose derivatives. *Pharm. Acta Helv.*, 70, 187–193.
- [Labuza et al., 1972] Labuza T.P., McNally L., Gallagher D., Hawkes J., Hurtado F., 1972. Stability of intermediate moisture foods. 1. Lipid oxidation, *J. Food Sci.*, 37, 154–159.
- [Lachowicz et al., 1998] Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcock A., Coventry M.J., 1998. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 209–214.
- [Lehner et al., 1993] Lehner S.J., Müller B.W., Seydel J.K., 1993. Interactions between p-hydroxybenzoic acid esters and hydroxypropyl- β -cyclodextrin and their antimicrobial effect against *Candida albicans*. *Int. J. Pharm.*, 93, 201–208.
- [Leistner, 2000] Leistner L., Basic aspects of food preservation by hurdle technology, 2000. *Int. J. Food Microbiol.*, 55, 181–186.
- [Mazurkiewicz et al., 2001] Mazurkiewicz J., Tomasik P., Zapłotny J., 2001. Relationships between water activity and viscosity of solutions. *Food hydrocoll.*, 15, 43–46.
- [Merianos, 1991] Merianos J.J., 1991. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. In: *Disinfection Sterilisation and Preservation* (Block, S.S., Ed.), 4th Edn., 225–255. Lea and Febinger, Philadelphia.
- [Monroy et al., 1993] Monroy E., Wolff N., Ducruet V., Feigenbaum A., 1993. A FTIR method for the determination of total specific migration of aromatic plasticizers from poly (vinyl chloride). *Analisis*, 21, 221–226.
- [Mukerjee, 1971] Mukerjee P., 1971. Solubilization of benzoic acid derivatives by nonionic surfactants: location of solubilizates in hydrocarbon core of micelles and polyoxyethylene mantle, *J. Pharm. Sci.*, 60, 1528–1534.
- [Mussard, 2006] Mussard J., 2006. Les parabens, des conservateurs omniprésents: un risque pour la santé?, Thèse de doctorat.

- [Nicklin et al., 2000] Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R., *L'essentiel en microbiologie*, Ed Berti, 2000, 365p., Paris.
- [Oishi, 2002] Oishi S., 2002. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1807–1813.
- [Orth et al., 1989] Orth D.S., Anderson C.L., Smith D.K., Milstein S.R., 1989. Synergism of preservative system components: use of the survival curve slope method to demonstrate anti-*Pseudomonas* synergy of methyl paraben and acrylic acid homopolymer/copolymers in vitro. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 40, 347–365.
- [Orth et Kabara, 1998] Orth D.S., Kabara J.J., 1998. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs application of hurdle technology. *Cosmet. toiletries*, 113, 51–58.
- [Panikov, 1995] Panikov, N. S., 1995. *Microbial growth kinetics*. Springer Science & Business Media, Chapman & Hall, London.
- [Pasquet et al., 2015] Pasquet J., Chevalier Y., Couval E., Bouvier D., Bolzinger M.A., 2015. Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients. *Int. J. Pharm.*, 479, 88–95.
- [Patel et Kostenbauder, 1958] Patel N.K., Kostenbauder H.B., 1958. Interaction of preservatives with macromolecules I. Binding of parahydroxybenzoic acid esters by polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (Tween 80). *J. Am. Pharm. Assoc.*, 47, 289–293.
- [Patrone et al., 2010] Patrone V., Campana R., Vittoria E., Baffone W., 2010. In vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol.*, 60, 237–241.
- [Perrenoud et al., 1994] Perrenoud D., Bircher A., Hunziker T., Suter H., Bruckner-Tuderman L., Stäger J., Thürlimann W., Schmid P., Suard A., Hunziker N., 1994. Frequency of sensitization to 13 common preservatives in Switzerland. *Contact Dermatitis*, 30, 276–279.
- [Pethybridge et al., 1983] Pethybridge A.D., Ison R.W., Harrigan W.F., 1983. Dissociation constant of sorbic acid in water and water-glycerol mixtures at 25°C from conductance measurements. *J. Food Technol.*, 18, 789–796.
- [Pisano et Kostenbauder, 1959] Pisano F.D., Kostenbauder H.B., 1959. Interaction of preservatives with macromolecules II. Correlation of binding data with required preservative concentrations of p-hydroxybenzoates in the presence of Tween 80. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 48, 310–314.
- [Pittet et Boyce, 2001] Pittet D., Boyce J.M., 2001. Hand hygiene and patient care: pursuing the Semmelweis legacy. *Lancet Infect. Dis.*, 1, 9–20.
- [Pol et Smid, 1999] Pol I.E., Smid E.J., 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 166–170.

- [Presser et al., 1997] Presser K., Ratkowsky D.A., Ross T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2355–2360.
- [Rahman et Labuza, 1999] Rahman M.S., Labuza T.P., 1999. Water activity and food preservation, M.S. Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation*, Marcel Dekker, New York, 339–382.
- [Robinson et al., 1998] Robinson T.P., Ocio M.J, Kaloti A., Mackey B.M., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiol.*, 44, 83–92.
- [Sabalitschka et Priem, 1939] Sabalitschka T., Priem A., 1939. Über die antimikrobe Wirkung von Desinfektions-und Konservierungsmitteln bei Gegenwart von tierischen und pflanzlichen Ölen und Fetten sowie Mineralölen. *Fette und Seifen*, 46, 277–281.
- [Scott, 1953] Scott W.J., 1953. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30°C, *Aust. J. Biol. Sci.*, 6, 549–564.
- [Shao et al., 2003] Shao H., Jiang L., Meng W.D., Qing F.L., 2003. Synthesis and antimicrobial activity of a perfluoroalkyl-containing quaternary ammonium salt, *J. Fluorine Chem.*, 124, 89–91.
- [Sierget, 2006] Siegert W., 2006. The benefit of using synergistic mixtures of preservatives. *SÖFW-journal*, 132.
- [Silindir et Ozer, 2009] Silindir M., Ozer A.Y., 2009. Sterilization methods and the comparison of E-Beam sterilization with gamma radiation sterilization. *J. Pharm. Sci.*, 34, 43–53.
- [Son et Sun, 2003] Son Y.A., Sun G., 2003. Durable antimicrobial nylon 66 fabrics: ionic interactions with quaternary ammonium salts, *J. Appl. Polym. Sci.*, 90, 2194–2199.
- [Soni et al., 2001] Soni M.G., Burdock G.A., Taylor S.L., Greenberg N.A., 2001. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Tox.*, 39, 513–532.
- [Tassou et al., 1995] Tassou C.C., Drosinos E.H., Nychas G.J.E., 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10 C. *J. Appl. Bact.*, 78, 593–593.
- [Torres et Karel, 1985] Torres J.A., Karel M., 1985. Microbial stabilization of intermediate moisture food surfaces. III. Effects of surface preservative concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analog, *J. Food Process. Preserv.*, 9, 107–119.
- [Varvaresou et al., 2009] Varvaresou A., Papageorgiou S., Tsirivas E., Protopapa E., Kintziou H., Kefala V., 2009. Self-preserving cosmetics, *Int. J. Cosmetic Science*, 31, 163–175.

[Willey, 2008] Willey, J.M., 2008. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology-7th international ed., Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton. New York, McGraw-Hill Higher Education.

[Woodruff, 1999] Woodruff J., 1999. Exploiting synergies in preservatives. *Manuf. Chemist*, 70, 18–20.

[Youssef et al., 1973] Youssef M.K., Sina A., Kassem A.A., Ibrahim S.A., Attia M.A., 1973. Interactions between polyethylene plastic containers and certain preservatives and vitamins. *Indian J. Pharm.* 155–158.

[Zaied et al., 2007] Zaied S.F., Youssef B.M., Desouky O., El Dien M.S., 2007. Decontamination of gum arabic with γ -rays or electron beams and effects of these treatments on the material. *Appl. Radiat. Isot.*, 65, 26–31.

[Zapico et al., 1998] Zapico P., Medina M., Gaya P., Nuñez M., 1998. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 35–42.

Etude bibliographique

Chapitre III :

Les conditionnements actifs antimicrobiens

Introduction

L'emballage ou conditionnement présente de nombreuses fonctions techniques, sociales et économiques :

- *Fonction économique pour les industriels* : manutention, stockage,...
- *Fonction technique de protection* : mécanique, thermique, physico-chimique,... Les emballages visent à protéger les produits du contact avec l'atmosphère extérieur pouvant occasionner de l'oxydation, du dessèchement, un changement d'aspect du produit ainsi qu'un développement de micro-organismes.
- *Fonction de service au consommateur* : information, praticité, stockage,...
- *Fonction d'information et de présentation* découlant d'obligations légales, de contraintes techniques et d'actions de communication ou de marketing.

Les emballages ont donc un rôle majeur et, à ce titre, ils sont vecteurs d'innovations car ils représentent à la fois une stratégie incontournable pour le lancement de nouveaux produits et un élément de différenciation par rapport à la concurrence. Dans ce contexte, des emballages présentant des fonctions novatrices ou de nouveaux matériaux constitutifs sont autant d'outils techniques, sécuritaires, marketing et commerciaux permettant l'amélioration de la compétitivité des entreprises.

Il est possible de distinguer trois catégories de conditionnements de par la nature des interactions avec le contenu :

- Les *conditionnements passifs* qui ont comme fonction de protéger le contenu contre les altérations de l'environnement.
- Les *conditionnements intelligents* qui fournissent des informations sur l'évolution du produit ou de son environnement.
- Les *conditionnements actifs* qui modifient l'environnement et/ou la composition du produit emballé pour augmenter sa durée de vie et maintenir ou améliorer son état.

Les conditionnements actifs antimicrobiens connaissent aujourd'hui une utilisation importante dans des applications alimentaires. Les applications commerciales dans d'autres secteurs d'activité restent des cas uniques. Ce chapitre de thèse vise à faire un état de la technologie des conditionnements primaires actifs antimicrobiens et c'est la raison pour laquelle de nombreuses définitions ou exemples seront issus du domaine agro-alimentaire.

1. Les conditionnements actifs

1.1 Définition

La législation du domaine agro-alimentaire a défini les conditionnements actifs, en accord avec le règlement du parlement européen et du conseil du 27 octobre 2004 (règlement CE n°1935/2004), comme des matériaux contenant des constituants qui libèrent ou absorbent des substances dans les produits emballés ou dans leur environnement. Un conditionnement actif est donc un système conditionnement/produit/environnement qui agit de manière coordonnée afin d'assurer la qualité ainsi que l'innocuité du produit emballé, augmentant ainsi sa durée de conservation [Catalá et Gavara, 2001]. Cette nouvelle génération de conditionnements primaires possède des attributs au-delà des propriétés de barrières basiques et s'écarte de la caractéristique initiale des conditionnements qui est l'inertie vis-à-vis du produit.

1.2 Historique

Les conditionnements actifs ont été commercialisés dans les années 1970 au Japon, en Australie et aux Etats-Unis. Ils apparaissent au début du XXI^{ème} siècle dans l'Union Européenne. Ils sont actuellement sujets à des perspectives de recherche car ils permettent de mieux répondre aux évolutions du marché ainsi qu'aux exigences des consommateurs et des industriels [Gontard, 2000]. Leur intérêt s'est considérablement accru ces dernières années démontré par un marché mondial en pleine croissance (figure BIII.1).

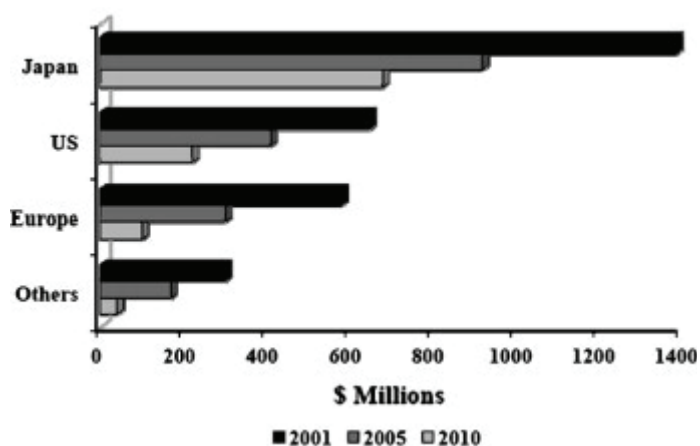


Figure BIII.1. Marché global en millions de dollars des conditionnements actifs entre 2001 et 2010 [Restuccia et al., 2010].

De nombreux types de conditionnements actifs sont disponibles : les absorbeurs d'odeurs et d'arômes, d'éthylène ou encore d'aldéhyde et de lactose par exemple [Ahvenainen, 2003].

Les plus utilisés sont les conditionnements actifs antimicrobiens qui font l'objet de la suite de cette étude bibliographique.

2. Les conditionnements actifs antimicrobiens

2.1 Preuve de concept

[Chi-Zhang et al., 2004] ont démontré que le mode de délivrance de l'agent antimicrobien agit de manière significative sur son efficacité. Les mesures ont été effectuées sur la nisine qui est un antimicrobien très utilisé dans le domaine agro-alimentaire. Le micro-organisme étudié est la bactérie *Listeria monocytogenes*. Ce pathogène a été sélectionné car il est omniprésent de par une faible température de croissance aux alentours de 4°C. De plus, il a démontré une sensibilité à l'activité de la nisine [Ming et al., 1997 ; Vignolo et al., 2000]. Dans leur étude, [Chi-Zhang et al., 2004] ont mesuré que l'addition instantanée de nisine cause presque immédiatement la mort des cellules de 5log suivie par une recroissance des cellules survivantes qui sont pour la plupart des mutantes et des cellules adaptées (figure BIII.2). Une addition lente pendant 100h ne cause pas une réduction aussi importante que lors d'un ajout rapide puisque une réduction de 2-3 log est atteinte. Cependant les cellules vivantes ne sont pas des mutantes résistantes. Le mode de délivrance combinée permet d'obtenir l'inhibition antimicrobienne la plus importante dans le temps démontrant qu'une addition lente peut fonctionner de manière synergique avec une addition instantanée. Ces résultats prouvent que les conditionnements antimicrobiens représentent un moyen efficace pour améliorer la préservation microbienne des produits puisqu'ils assurent une délivrance lente dans le produit qui contient déjà une quantité de conservateur.

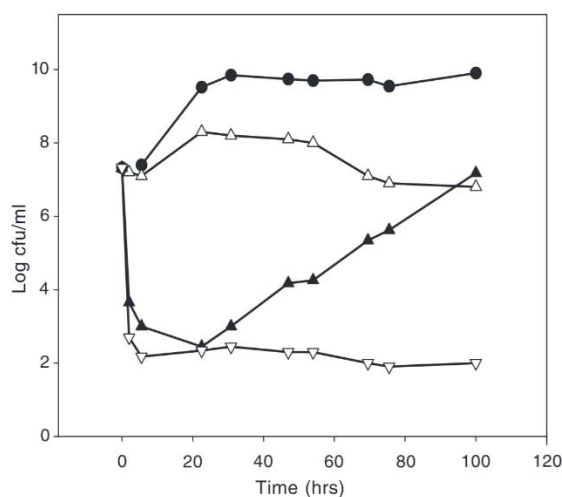


Figure BIII.2. Croissance de *Listeria monocytogenes* en fonction du mode de délivrance avec : (●) le contrôle en absence de nisine ; (▲) l'addition instantanée de 200UI/mL de nisine ;

(△) l'addition lente de 1000UI/mL de nisine ; (▽) l'addition combinée instantanée de 200UI/mL et lente de 500UI/mL de nisine [Chi-Zhang et al., 2004].

2.2 Objectifs

Parmi les différents conditionnements actifs existants, les conditionnements antimicrobiens représentent une technologie prometteuse en plein essor permettant le contrôle de la croissance des micro-organismes. De nombreux produits commerciaux actuellement sur le marché agro-alimentaire démontrent l'intérêt porté à ces emballages innovants (tableau BIII.1) [Suppakul et al., 2003 ; Vermeiren et al., 1999].

Tableau BIII.1. Exemples de différents conditionnements antimicrobiens commerciaux pour le domaine agro-alimentaire.

Forme physique	Nom commercial	Substance active	Fournisseur	Référence
absorbant d'oxygène sachet	Ageless [®] FreshPax [®] OS2000 [®]	à base de poudre de fer à base de poudre de fer cobalt catalysé	Mitsubishi Gas Chemical Co. (Japan) Multisorb Technologies Inc. (U.S.A.) Sealed Air Corporation (U.S.A.)	Lyver et al., 1998 Smith et al., 1995 Butler, 2002
absorbant d'oxygène film	Daraforms 6490	sulfite de sodium et ascorbate de sodium	Grace Darex Packaging Technologies (USA)	Cichello et al., 2015
absorbant de dioxyde de carbone sachet	Freshlock	hydroxyde de calcium	Mitsubishi Gas Chemical Co. (Japan)	Vermeiren et al., 1999
relargueur de dioxyde de carbone sachet	Verifrais [®]	à base d'acide ascorbique et de bicarbonate de soude	SARL Codimer (France)	Vermeiren et al., 1999
absorbant d'oxygène/relargueur de dioxyde de carbone sachet	Ageless G [®] Vitalon G [®]	à base d'acide ascorbique et de poudre de fer à base de poudre de fer	Mitsubishi Gas Chemical Co. (Japan) Toagosei Chemical Co. (Japan)	Smith et al., 1995 Vermeiren et al., 1999
relargueur d'éthanol sachet	Efflicap [®] Fretek [®]	éthanol microencapsulé éthanol microencapsulé	Freund Industrial Co. (Japan) Techno Intl. Inc (USA)	Smith et al., 1995 Brody et al., 2001
absorbant d'oxygène/relargueur d'éthanol sachet	Negamold [®]	/	Freund Industrial Co. (Japan)	Smith et al., 1995; Romero, 2000
absorbant d'humidité sachet	Minipax [®] Desipack [®]	gel de silice argile et gel de silice	United desiccants (USA) Multisorb Technologies Inc (U.S.A.)	Wei et al., 2011 Vermeiren et al., 1999
incorporation d'agents antimicrobiens directement dans la matrice polymérique poudre	MicroGard TM Nisaplin [®] AgION TM	à base de bactériocines à base de nisine à base d'ions argent	Rhone-Poulenc (U.S.A.) Integrated Ingredients (U.S.A.) AgION Technologies LLC (USA)	Lemay et al., 2002 Scannell et al., 2000; Guerra et al., 2005 Loertzer et al., 2006

Les emballages antimicrobiens limitent ou préviennent la contamination du produit par les bactéries et/ou les champignons en augmentant la période de latence ainsi qu'en réduisant le taux de croissance [Han, 2000]. Les objectifs principaux des conditionnements antimicrobiens sont de permettre d'étendre la durée de vie du produit ainsi que de maintenir sa qualité et son innocuité tout en réduisant les quantités d'agents antimicrobiens présents au sein même du produit [Appendini et Hotchkiss, 2002]. En effet, le conditionnement antimicrobien renforce l'activité antimicrobienne du produit grâce à une action ciblée en maintenant une concentration effective en conservateurs au sein de la formule afin d'obtenir la durée de vie désirée. Ceci représente un réel avantage afin de palier à l'utilisation croissante de conservateurs au sein des formules qui résulte notamment en des problèmes dermatologiques tels que des allergies ou des sensibilisations de contact [Perrenoud et al., 1994; Hong and Bielory, 2009; Bleasel et al., 2002].

2.3 Mécanismes d'action

Deux types de mécanismes assurent l'efficacité des emballages antimicrobiens [Suppakul et al., 2003]:

- *mécanisme de diffusion* par lequel les conservateurs migrent de la surface polymérique vers le produit pour empêcher la croissance de micro-organismes [Luck et Jager 1997]
- *mécanisme de contact* par lequel les agents antimicrobiens immobilisés ne migrent pas dans le produit et agissent lorsque le micro-organisme ciblé rentre en contact avec la surface traitée [Kourai et al, 1994, Vermeiren et al., 2002].

Un antimicrobien qui agit par diffusion peut également agir par contact, l'inverse n'est pas vérifié. En effet, dans le cas d'une activité antimicrobienne nécessitant un contact avec la membrane ou paroi cellulaire les deux mécanismes d'action pourront être retenus. Si l'activité antimicrobienne est relative à une pénétration dans le cytoplasme seul le mécanisme par diffusion permettra d'obtenir les résultats escomptés.

3. Les différentes catégories de conditionnements actifs antimicrobiens

Trois types de conditionnements antimicrobiens existent et parmi eux il faut distinguer ceux pour lesquels :

- la matière antimicrobienne est placée dans un sachet à l'intérieur du conditionnement (figure BIII.3.A.)

- l'agent antimicrobien est intégré à l'intérieur du matériau utilisé pour le conditionnement (figure BIII.3.B.)
- l'agent antimicrobien est enduit ou adsorbé à la surface du matériau polymère (figure BIII.3.C. et figure BIII.3.3.D.)
- l'agent antimicrobien est immobilisé à la surface du polymère de conditionnement grâce à des liaisons ioniques ou covalentes (figure BIII.3.E. et figure BIII.3.F.)
- le matériel de conditionnement possède intrinsèquement les propriétés antimicrobiennes recherchées (figure BIII.3.G.)

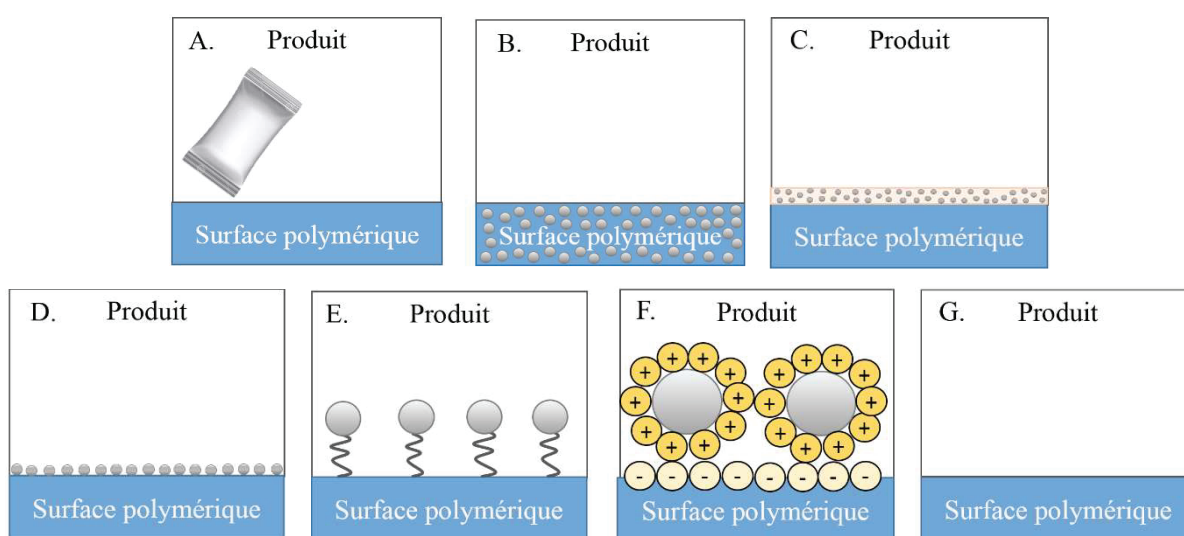


Figure BIII.3. A : Conditionnement avec sachet antimicrobien ; B. agent antimicrobien intégré au sein du matériau de conditionnement ; C. agent antimicrobien enduit à la surface du conditionnement ; D. agent antimicrobien adsorbé à la surface du conditionnement ; E. agent antimicrobien immobilisé à la surface du conditionnement par liaisons covalentes ; F. agent antimicrobien immobilisé à la surface du conditionnement par liaisons ioniques ; G. matériel de conditionnement ayant des propriétés antimicrobiennes intrinsèques.

L'agent antimicrobien utilisé ainsi que la technique de fonctionnalisation mise en œuvre doivent être rigoureusement sélectionnés car l'activité antimicrobienne résultante en dépend.

3.1 Utilisation de sachets contenant l'agent antimicrobien

Les applications commerciales les plus utilisées concernent les sachets antimicrobiens qui sont introduits dans le conditionnement pour le domaine agro-alimentaire. Quatre formes sont prédominantes : les absorbeurs d'oxygène, les émetteurs de dioxyde de carbone, les émetteurs d'éthanol ainsi que les absorbeurs d'humidité.

➤ Absorbants d'oxygène

L'oxygène favorise les développements bactériens ou fongiques aérobies [Smith et al., 1990]. Les systèmes absorbants d'oxygène réduisent le taux d'oxygène présent dans l'espace de tête du conditionnement ou dans le produit lui-même à une valeur inférieure à 0,01% permettant ainsi d'accroître la durée de conservation de divers produits [De Kruijf et al., 2002]. Dans le domaine agro-alimentaire par exemple, De Leiris, 1994 a démontré que l'utilisation d'un absorbant d'oxygène dans l'emballage d'un pain en tranches permet de retarder l'apparition de moisissures de 4 jours à plus de 20 jours. Différents absorbants d'oxygène sont disponibles sur le marché et sont basés sur l'oxydation d'une ou plusieurs des substances suivantes [Floros et al., 1997]:

- poudre de fer
- acide ascorbique ou ascorbate de sodium
- enzymes comme le glucose oxydase ou l'éthanol oxydase
- acides gras insaturés tels que les acides oléique ou linoléique

L'utilisation d'absorbants d'oxygène doit être couplée avec un matériau de conditionnement ayant au minimum une performance intermédiaire de barrière à l'oxygène ambiant typiquement égale à 20mL/m²/jour/atm. Dans le cas contraire, l'absorbant deviendrait rapidement saturé lui faisant perdre sa capacité à piéger l'oxygène. Ce système représente une alternative plus économique par rapport à l'utilisation de matériaux barrières très performants sans absorbants d'oxygène [Smith et al., 1990].

➤ Emetteurs de dioxyde de carbone

Dans certains cas des concentrations importantes en CO₂ (60-80%) sont nécessaires pour obtenir un effet bactériostatique permettant de prolonger la durée de conservation du produit [Labuza, 1996 ; De Kruijf et al., 2002]. En effet, Naito et al., 1991 ainsi que Lövenklev et al., 2004 ont démontré que des systèmes commerciaux émetteurs de dioxyde de carbone inhibent la croissance des bactéries et notamment de *Clostridium botulinum*. Les systèmes émetteurs de dioxyde de carbone sont généralement à base d'acide citrique, malique ou tartrique. Ils peuvent également trouver leur application en combinaison avec des absorbants d'oxygène [Smith et al., 1995].

➤ Emetteurs d'éthanol

L'éthanol est utilisé en routine dans les conditionnements pour des applications médicales et pharmaceutiques pour sa qualité d'inhibiteur de contaminations microbiennes. Dans le

domaine agro-alimentaire, Smith et al., 1987 ont démontré l'utilité de la vapeur d'éthanol pour augmenter la durée de conservation de chaussons aux pommes. En effet, la durée de conservation est de 14 jours pour le produit conditionné dans l'air. Les sachets d'éthanol encapsulé incorporé dans les conditionnements ont étendu la durée de conservation à 21 jours en supprimant totalement la croissance de levures notamment. L'utilisation de l'effet combiné d'absorbeur de dioxygène et d'émetteur d'éthanol est également possible pour préserver les produits des différentes contaminations microbiennes.

➤ Absorbants d'humidité

Afin de prévenir les croissances microbiennes non désirées au sein d'un produit, les absorbants d'humidité sont utilisés. Les absorbants d'humidité réduisent l'activité de l'eau (a_w , cf *Etude bibliographique – Partie 2 – sous chapitre 5.3.1 Activité de l'eau*) ce qui permet de réduire la croissance de moisissures, levures et bactéries. Par exemple, la durée de conservation de conditionnements de tomates à 20°C a été étendue de 5 à 17 jours grâce à un sachet contenant du chlorure de sodium [Shirazi et Cameron, 1992]. Les dessiccateurs tels que l'argile ou encore les gels de silice sont usuellement utilisés pour des produits non liquides.

Récemment, des films contenant l'agent antimicrobien à l'intérieur du matériau de conditionnement ou bien à sa surface ont été développés. Ces films sont avantageux car ils éliminent le risque de rupture accidentelle du sachet et la consommation par inadvertance de son contenu [Suppakul et al., 2003]. De plus, ils peuvent être utilisés avec des produits liquides. L'action antimicrobienne de ces films peut être obtenue grâce à différentes natures d'agents antimicrobiens répertoriés dans le tableau BIII.2.

Tableau BIII.2. Liste des agents antimicrobiens incorporés au sein des conditionnements antimicrobiens ou à leur surface.

	Agent antimicrobien	Nature du film	Micro-organismes atteints	Références
acide organique	acide sorbique	film comestible, PEBD	bactérie, levure, champignon	Cagri et al., 2001; Guillard et al., 2009; An et al., 2000; Weng et al., 1997
	acide benzoïque	PEMA	champignon, levure	Weng et al., 1999; Chen et al., 1999
	acide acétique	chitosane, PEBD	bactérie	Ouattara et al., 2000a et b; Siragusa et Dickinson, 1992; Grower et al., 2004
	acide propionique	chitosane	bactérie	Ouattara et al., 2000a et b
	acide lactique	alginate, PEBD	bactérie	Siragusa et Dickinson, 1992; Eswaranandam et al., 2004
sel d'acide organique	potassium sorbate	PEBD, film comestible	levure, moisissure, bactérie	Han et Floros, 1997; Pranoto et al., 2005; Vartiainen et al., 2003b; Flores et al., 2007
	potassium benzoate	film comestible	champignon	Chen et al., 1996
	sodium benzoate	PEBD, film comestible	champignon, bactérie	Chen et al., 1996; Vartiainen et al., 2003b
anhydride d'acide	anhydride benzoïque	PEBD	champignon, moisissure	Weng et Hotchkiss, 1993; Dobias et al., 2000
	anhydride sorbique	PEBD	champignon	Weng et Chen, 1997
bactériocine	nisine	PEBD, film comestible	bactérie	Natrajan et Sheldon, 2000a et b; Imran et al., 2010; Ku et Song, 2007; Mauriello et al., 2005; Grower et al., 2004; Dawson et al., 2002; Pranoto et al., 2005
	pediocine	film comestible, PEBD	bactérie	Santiago-Silva et al., 2009; Ming et al., 1997
	lacticine	PEBD	bactérie	An et al., 2000
enzyme	lysozyme	film comestible, cellulose, nylon	bactérie	Padgett et al., 1998; Conte et al., 2006a et b; Min et al., 2008; Rodrigues et Han, 2000; Arcan et Yemenicioğlu, 2013
	lactoperoxydase	film comestible	bactérie, champignon	Min et al., 2005a, b et c; Fatih et al., 2009; Mohamed et al., 2013
agent chélatant	EDTA	PEBD, film comestible	bactérie	Padgett et al., 1998; Hoffman et al., 2001; Vartiainen et al., 2003a
métaux	Ion et nanoparticule d'argent	PEBD, film comestible	bactérie	Ishitani, 1995; Rhim et al., 2006; Dubas et al., 2006; Ghosh et al., 2010; Del Nobile et al., 2004
extraits de plante	cinnamaldéhyde	cellulose, chitosane, EVA	bactérie, levure	Sanla-Ead et al., 2012; Ouattara et al., 2000a; Nostro et al., 2012
	carvacrol	film comestible, PP	bactérie	Rojas-Grau et al., 2007; Ramos et al., 2012
	huile d'ail	film comestible, chitosane	bactérie	Pranoto et al., 2005; Seydim et Sarikus, 2006
	extrait de pépin de pamplemousse	PEBD; film comestible	bactérie, levure	Ha et al., 2001; Hong et al., 2009
fongicide	Imazalil	PEBD	moisissure	Weng and Hotchkiss 1993; Vartiainen et al., 2003a
polysaccharide	chitosane	PEBD, film comestible	bactérie, champignon	Dutta et al., 2009; Coma et al., 2002; Begin et Calsteren, 1999; Rhim et al., 2006

3.2 Incorporation directe d'agents antimicrobiens au sein du matériel de conditionnement

La solution la plus simple techniquement est d'incorporer l'agent antimicrobien directement dans le polymère formant le conditionnement. Pour assurer une répartition homogène il est préférable que l'antimicrobien soit soluble dans le polymère aux concentrations utilisées qui se trouvent généralement entre 0,1 et 5% [Appendini et Hotchkiss, 2002]. De plus, il faut également prendre en compte les conditions de réalisation du conditionnement. En effet, pour les polyéthylène et polypropylène par exemple, des procédés d'extrusion ou de moulage par injection haute température (environ 250°C) sont nécessaires. La stabilité chimique de l'antimicrobien sélectionné est donc un paramètre important qui peut être affectée par les températures utilisées ainsi que par les forces de cisaillement et de pression [Han et Floros, 1999]. Les zéolites d'argent qui peuvent supporter des températures allant jusqu'à 800°C sont souvent utilisés pour être incorporés en fines couches co-extrudées à la surfaces des polymères polyoléfines. Les zéolites d'argent sont généralement dispersés au sein même de la matrice entre 1 et 3% [Ishitani, 1995 ; Appendini et Hotchkiss, 2002 ; Brody et al., 2001]. Pour ces techniques de réalisation du conditionnement utilisant des températures élevées supérieures à 100°C, des agents antimicrobiens thermosensibles ne peuvent pas être utilisés car ils risquent de se dégrader ou de se dénaturer [Devlieghere, 2000, Vermeiren et al., 2002 ; Ishitani, 1995]. Padgett et al., 1998 ont notamment mesuré que l'efficacité de différents films contenant du lysozyme et de la nisine est moins importante sur *Escherichia coli* lorsque les films sont réalisés à haute température. Il a par également été quantifié que l'activité antimicrobienne de la nisine est trois fois moins importante lorsqu'elle est incorporée dans les films à haute température et ce pour plusieurs matrices que sont la méthylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose, et le chitosane [Cha et al., 2001].

3.3 Fonctionnalisation de la surface du conditionnement: enduction de films ou adsorption d'agents antimicrobiens

3.3.1 Enduction de films

La surface du conditionnement peut être fonctionnalisée en réalisant une couche antimicrobienne grâce à un agent liant qui peut être antimicrobien par nature et/ou qui va permettre l'adhésion de l'actif antimicrobien. Cette méthode de réalisation de films basse température est très utilisée notamment dans le cas d'incorporation d'agents antimicrobiens thermosensibles [Appendini et Hotchkiss, 1997]. Cette technique nécessite l'utilisation d'un solvant qui permet la création du film polymérique après évaporation. Les biopolymères sont des candidats appropriés pour ce type de procédé de par leur solubilité dans l'eau, l'éthanol et de nombreux autres solvants compatibles avec les conservateurs [Appendini et Hotchkiss,

2002]. En prenant l'exemple du domaine agro-alimentaire, des polymères comestibles sont souvent utilisés pour l'enduction de films contenant des agents antimicrobiens à la surface des matériaux de conditionnement [Cooksey, 2000].

➤ Les films intrinsèquement antimicrobiens

Certains polymères ont un rôle double : ils constituent la matrice du film et sont également antimicrobiens par nature. C'est le cas par exemple du chitosane et de la nisine. Dans ce cas il n'est pas obligatoire d'ajouter des agents antimicrobiens dispersés au sein du film afin d'obtenir une action conservatrice.

Le chitosane est un polymère naturel qui est reconnu pour ses propriétés antimicrobiennes de par la présence de fonctions amines sur son squelette polysaccharidique [Darmadji et Izumimoto, 1994]. En effet, à un pH inférieur à 6, il devient un polycation portant des fonctions ammoniums qui interagissent avec les parois cellulaires des bactéries à gram négatif provoquant ainsi la fuite des constituants intracellulaires [Goldberg, 1990]. Des films de chitosane ont été réalisés à partir de solutions d'acide acétique diluées par Chen et al., 1996. Ils ont démontré leur efficacité sur *Rhodotorula rubra* et *Penicillium notatum* par une zone d'inhibition autour du film après incubation à 24°C pendant 48h grâce aux tests de diffusion en milieux gélosés.

L'activité de films de nisine seule à la surface de conditionnements polyéthylène a été étudiée par Grower et al., 2004 grâce à des tests de diffusion en milieux gélosés. Il a été démontré un effet inhibiteur sur la prolifération de *Listeria monocytogenes* à 37°C pendant 48h. Mauriello et al., 2005 a également prouvé l'efficacité de film de nisine enduits sur des surfaces de polyéthylène sur *Micrococcus Luteus*. En effet, il a été mesuré une réduction de la croissance microbienne de 0,9 log et 1,3 log sur 1 litre de lait cru et du lait pasteurisé respectivement conditionné dans les conditionnements actifs.

➤ Ajout d'agents antimicrobiens

Le plus souvent, qu'il soit utilisé des matrices polymériques possédant des propriétés antimicrobienne ou non, des agents antimicrobiens sont introduits au sein des films enduits à la surface des conditionnements primaires.

Afin d'incorporer des agents antimicrobiens des liants comestibles peuvent être utilisés. En effet, les travaux de Natrajan et Sheldon, 2000a et b démontrent l'efficacité des films de nisine contenant de l'acide citrique et de l'acide éthylène diamine tétra-acétique enduits sur différents matériaux de conditionnement tels que le polychlorure de vinyle, le polyéthylène basse densité et le nylon qui permettent une réduction de *Salmonella Typhimurium* d'un log de 2,1 comparé à 0,4 sans traitement. Möller et al., 2004 ont quant à eux utilisé des films à base d'hydroxypropylméthylcellulose contenant de l'acide stéarique permettant une diminution de

la nature hydrophile des films et une augmentation des propriétés barrières à l'humidité, résultant ainsi en une inhibition complète de la croissance de *Listeria monocytogenes*.

Des liants non comestibles comme les résines polyamides par exemple peuvent également être utilisés pour accroître la compatibilité entre les surfaces polymériques des conditionnements et les agents antimicrobiens [An et al., 2000]. Kim et al., 2002 ont sélectionné un liant à base de polyamide pour l'incorporation de nisine et lacticine à la surface de polyéthylène. Les

travaux de Ha et al., 2001 ont prouvé que l'incorporation d'extrait de pamplemousse à la surface d'un conditionnement de polyéthylène grâce à un liant à base de polyamide résulte en une efficacité antimicrobienne plus importante que s'il était incorporé par co-extrusion dans le polyéthylène. En effet, le film co-extrudé à 1% d'agent antimicrobien possède une activité contre *Micrococcus avus* ATCC 10240, alors que le film enduit avec le liant et l'extrait de pamplemousse à 1% démontre une activité sur plusieurs micro-organismes tels que *Escherichia coli* IFO 3301, *Staphylococcus aureus* IFO 3060 et *Bacillus subtilis* IFO 12113. Des liants à base de copolymère d'éthylène et d'acétate de vinyle peuvent aussi être utilisés [Lee et al., 2003 ainsi que Kim et al., 2002].

Un effet dose a été identifié par différents travaux démontrant que l'activité antimicrobienne dépend de la concentration en conservateurs introduits au sein du film.

Une efficacité reliée à la dose a été mesurée pour l'inhibition de *Listeria monocytogenes* par Cha et al., 2003 ainsi que Franklin et al., 2004 pour des films à base de méthylcellulose et d'hydroxypropylméthylcellulose contenant de la nisine sur du polyéthylène. Franklin et al., 2004 ont notamment reporté une diminution de croissance de 2 log pendant 60 jours d'études à 4°C pour des concentrations en nisine de 7.500IU/mL et 10.000 IU/mL contrairement à 156,3IU/mL qui ne démontre pas d'effets conservateurs particuliers. Cha et al., 2003 ont mesuré que la population de *Listeria monocytogenes* sur du tofu n'était pas affectée par la présence de films de cellulose contenant de la nisine à 100IU/g, tandis la croissance est retardée à 500IU/g et inhibée avec l'utilisation de 1000IU/g. Sayanjali et al., 2011 ont quant à eux démontré l'efficacité de films de carboxyméthylcellulose contenant du sorbate de potassium et enduits à la surface de polyéthylène pour l'inhibition de *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus*. L'effet dose a été observé pour des quantités d'agents antimicrobiens introduites supérieures à 2g avec des zones d'inhibition nettement supérieures pour 3g et 4g de sorbate de potassium.

3.3.2 Adsorption d'agents antimicrobiens

L'adsorption d'agents antimicrobiens sur des surfaces polymériques non traitées nécessite l'existence d'une affinité entre la substance active et le matériau. Les protéines ont notamment une capacité importante d'adsorption grâce à leurs structures amphiphiles. Bower et al., 1995

ainsi que Ming et al., 1997 ont par exemple démontré que la nisine adsorbée sur des surfaces de silice silanisées permet d'empêcher la croissance de *Listeria monocytogenes*. D'autres exemples incluent l'adsorption de nisine sur le polyéthylène, l'éthylène-acétate de vinyle, le polypropylène, le polytéréphtalate d'éthylène ainsi que le polychlorure de vinyle [Brower et al., 1995 et Wilhoit, 1996]. Ming et al., 1997 ont quant à eux étudié l'adsorption de la protéine de pédiocine sur des surfaces polyoléfiniques et ont démontré une action antimicrobienne sur *Listeria monocytogenes*.

Certains traitements sont possibles dans le cas de matériaux qui n'ont peu ou pas d'affinité avec les substances antimicrobiennes afin d'améliorer leur adsorption. Il a par exemple été démontré qu'un traitement avec de l'hydroxyde de sodium permet d'augmenter la polarité de la surface polymérique qu'est le poly(éthylméthacrylate). Ceci a pour effet de favoriser l'adsorption d'acides benzoïque et sorbique passant de 0 sans traitement à 75mg et 55mg adsorbés respectivement. Ainsi cela permet l'inhibition totale de la croissance de *Penicillium sp* [Weng et al., 1999].

3.4 Immobilisation d'agents antimicrobiens

Il est possible de réaliser une immobilisation des actifs antimicrobiens sur le polymère formant le conditionnement de par des interactions électrostatiques [Weng et al., 1997] ou des liaisons covalentes [Haynie, 1995]. Le procédé d'immobilisation requiert la présence de groupements fonctionnels à la surface de la matrice polymérique et de l'agent antimicrobien. L'immobilisation d'agents antimicrobiens grâce à des liaisons électrostatiques peut permettre, selon les conditions, une libération lente vers le milieu extérieur. Cependant, la diffusion est moins probable lorsque l'antimicrobien est lié de manière covalente au polymère à part si les conditions à l'intérieur du produit favorisent l'hydrolyse.

3.4.1 Immobilisation ionique

Les antimicrobiens immobilisés par interactions électrostatiques nécessitent un contrôle du pH et de la force ionique. Wang et Chio, 1998 ont démontré que avec un pH>6 100% des protéines de chitinase sont liées de manière covalente sur un support polymérique contrairement à 20% obtenues à pH=4. Weng et al., 1997 ont quant à eux modifié la structure d'un film ionomère et converti les fonctions -COONa en -COOH grâce à de l'acide chlorhydrique afin de favoriser les interactions avec le chlorure de benzoyle. Le film obtenu permet d'inhiber la croissance des espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus niger*.

3.4.2 Immobilisation covalente

Les peptides sont des candidats appropriés pour l'immobilisation covalente à la surface des polymères grâce aux groupements fonctionnels amine ou carboxylique. Par exemple, le lysozyme a été immobilisé de manière covalente sur des surfaces formées par l'alcool polyvinylique et le triacétate de cellulose [Appendini et Hotchkiss, 1997 ; Conte et al., 2006a et b]. Scannel et al., 2000 ont également montré que la nisine forme des liaisons stables avec les films de polyéthylène/polyamide contrairement à la lacticine prouvant que l'affinité matrice/agent antimicrobien est un facteur important à prendre en compte pour l'interaction. Afin de fonctionnaliser les surfaces inertes comme le polyéthylène, polypropylène ou poly(téréphtalate d'éthylène) et polystyrène, des méthodes chimiques ou physiques telles que le plasma et les traitements laser peuvent être utilisées [Ozdemir et al., 1999]. Vartiainen et al., 2005 ont par exemple utilisé des films de polypropylène activés par plasma afin d'immobiliser de manière covalente du glucose oxydase permettant l'inhibition complète de *Escherichia coli* et une réduction importante de la croissance de *Bacillus subtilis*.

3.4.3 Activité antimicrobienne résultant de l'immobilisation

Dans le cas d'agents antimicrobiens immobilisés à la surface du conditionnement primaire la réduction possible de l'activité antimicrobienne due à l'immobilisation doit être considérée. Pour les protéines et les peptides, les changements de configuration et la dénaturation possible résulte en une baisse d'activité. Afin d'augmenter l'activité il est nécessaire de protéger les sites actifs durant la formation du film. Il est également possible d'incorporer des dendrites afin d'augmenter la surface des supports [Soares et Hotchkiss, 1998]. L'immobilisation nécessite aussi des molécules permettant d'espacer le polymère à traiter de l'agent antimicrobien [Wang et Hsiue, 1993]. Ainsi il est donné une liberté de mouvement suffisante afin de permettre à la partie active de l'agent antimicrobien de rentrer en contact avec les micro-organismes. De plus, ils peuvent augmenter l'affinité entre le substrat et l'antimicrobien comme l'a démontré Appendini et Hotchkiss, 2000 en greffant du poly(éthylèneglycol) à la surface du polystyrène favorisant l'interaction avec un peptide antimicrobien.

3.5 Utilisation d'un polymère intrinsèquement antimicrobien

Il est possible d'utiliser un conditionnement primaire réalisé dans un matériau ayant des propriétés intrinsèque antimicrobiennes. Des modifications du polymère par traitement UV, irradiation d'électrons, plasma, traitement laser ou encore corona sont possibles afin de rendre les surfaces antimicrobiennes [Ozdemir et al., 1999]. Par exemple, le potentiel antimicrobien des films polyamides traités avec des irradiations UV a été rapporté. En effet, l'utilisation d'une irradiation UV à 193nm permet de convertir 10% des groupements amides en surface du nylon

en groupements amines ayant une activité antimicrobienne [Cohen et al., 1995 ; Paik et al., 1998 ; Shearer et al., 2000]. Les groupements amines chargés positivement présents à la surface permettent une réduction de la croissance des cellules bactériennes incluant *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Enterococcus faecalis*. Cette diminution de concentration des cellules bactériennes est due à l'action bactéricide du polymère et n'est pas le résultat de la simple immobilisation ionique des cellules vivantes [Paik, 1998].

Des traitements chimiques permettent aussi de modifier la surface des matrices polymériques des conditionnements en y introduisant des groupements fonctionnels. Cho et al., 2000 reporte par exemple l'immobilisation d'un chito-oligosaccharide sur de l'alcool polyvinylique par réticulation. Il a été prouvé que ce polymère fonctionnalisé permet de supprimer presque totalement la croissance de *Staphylococcus aureus*. Bilyk et al, 2008 ont quant à eux mis au point des polymères antimicrobiens relargueurs de peroxyde d'hydrogène à base de polyéthylène imide sur lequel sont liées de manière covalente des molécules antimicrobiennes d'anthraquinone.

3.6 Encapsulation

L'encapsulation d'agents antimicrobiens représente une technologie prometteuse dans le domaine des conditionnements actifs. Da Silva Paula et al., 2009 ont étudié la préparation d'un copolymère de poly(styrène-co-acide acrylique) contenant des nanoparticules d'argent. Les études microbiologiques prouvent que ce matériau est actif contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus Aureus* suggérant que les ions argent sont libérés de la matrice polymérique vers le milieu extérieur. Imran et al., 2012 ont démontré l'efficacité de la nisine nanoencapsulée dans une matrice d'hydroxypropylméthylcellulose permettant une libération lente de l'agent antimicrobien résultant en une inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes*. Au-delà de démontrer l'efficacité d'antimicrobiens encapsulés, certains travaux démontrent que l'agent antimicrobien est davantage actif sous sa forme encapsulée par rapport à sa forme libre. Benech et al., 2002 ont notamment travaillé sur l'encapsulation de la nisine qui est sensible à la dégradation [Delves-Broughton, 1990]. Les travaux de Benech et al., 2002 ont démontré que l'encapsulation de la nisine dans les liposomes permet de le protéger et ainsi d'améliorer son action antimicrobienne. L'inhibition de *Listeria innocua* a été évaluée pendant 6 mois et il a été mesuré que la nisine encapsulée résulte en l'activité la plus importante avec une concentration finale en micro-organisme de 10^1 Unité Formant Colonie (UFC)/g comparé à 10^4 UFC/g pour la forme libre. Degnan et Luchansky, 1992 ont également démontré que l'efficacité de la pédiocine encapsulée est supérieure à celle de l'agent antimicrobien libre de par une protection de l'agent antimicrobien avec une augmentation de l'activité de 27,5% de la forme encapsulée par rapport à la forme libre. Al-Nalbulsi et al., 2006 ont utilisé l'encapsulation afin de protéger la lactoferrine du contact avec des agents comme les cations divalents qui interfèrent avec son activité antimicrobienne. A 10°C les films contenant l'agent antimicrobien encapsulé réduit le nombre de *Carnobacterium viridans* 1,4 log UFC/cm² fois plus que les films contenant la forme

non encapsulé après 28 jours. Il a été conclu que l'utilisation de la lactoferrine microencapsulée dans les films a protégé le conservateur de l'inactivation et améliore donc son activité antimicrobienne.

Les résultats de ces travaux permettent d'affirmer que l'encapsulation apporte plusieurs fonctions :

- *protection* : réduit ou élimine l'affinité des agents antimicrobiens avec les composés de la formule [Al-Nalbulsi et al., 2006]
- *fonctionnalité* : activité et biodisponibilité supérieures par rapport à la forme libre de par la protection apportée [Benech et al., 2002 ; Degnan et Luchansky, 1992 ; Al-Nalbulsi et al., 2006]
- *économique* : les doses d'antimicrobiens nécessaires sont moins importantes par rapport à la forme libre [Imran, 2011]

La libération contrôlée et prolongée résultant de l'encapsulation n'est plus à démontrer [Sorrentino et al., 2007 ; Salmaso et al., 2004]. Cependant à notre connaissance elle n'est que très rarement étudiée pour les conditionnements actifs bien que certaines études supposent une application prometteuse [Appendini et Hotchkiss, 2002 ; Guiga et al., 2009].

4. Comparaison des différentes méthodes de fonctionnalisation

Chaque technique de réalisation de conditionnements actifs antimicrobiens présente des avantages et des inconvénients développés dans les parties précédentes et répertoriés dans le tableau BIII.3.

Tableau BIII.3. Avantages et inconvénients des différentes méthodes de fonctionnalisation du conditionnement primaire.

Méthode de fonctionnalisation	Avantages	Inconvénients
Incorporation directe	- Faisabilité industrielle: conservation des outils de mise en œuvre	- Paramètres de mise en œuvre contraignants (température, forces de cisaillement...)
Enduction/adsorption	- Revêtement sur une large gamme de conditionnements primaires - Technique utilisant des conditions douces	- Affinité antimicrobienne/matrice nécessaire - Choix d'un liant compatible avec le matériau de conditionnement
Encapsulation	- Contrôle de la libération - Maîtrise des interactions entre les agents antimicrobiens et le produit	- Choix d'un matériau d'encapsulation qui respecte les normes du produit final et qui supporte les conditions de mise en œuvre de l'emballage
Immobilisation	- Absence de diffusion dans le produit - Action antimicrobienne non limitée dans le temps	- Affinité antimicrobienne/matrice nécessaire - Possibilité de réduction de l'efficacité de l'actif antimicrobien - Action antimicrobienne limitée à un mécanisme de contact

5. Paramètres à prendre en compte lors de la réalisation d'un conditionnement actif antimicrobien

Il y a de nombreux challenges techniques reliés aux méthodes d'introduction directe d'agents antimicrobiens au sein des matrices. Il est notamment essentiel d'étudier l'impact sur les films formés à savoir les effets sur les propriétés physiques et chimiques ou encore les effets sur la capacité de diffusion de l'antimicrobien afin de fournir une efficacité optimale sur la durée de vie du produit.

5.1 Modification des propriétés physico-chimiques des films polymériques

Les effets de l'antimicrobien incorporé sur les propriétés du polymère peuvent être nombreux. Par exemple, selon le taux de charge, l'incorporation de molécules ou particules antimicrobiennes peut changer les propriétés mécaniques et optiques du polymère [Dobias et al., 2000]. Han et Floros, 1997 n'ont pas mesuré de différences significatives dans les propriétés de contrainte à la rupture avant et après l'incorporation du sorbate de potassium dans des films

de polyéthylène basse densité, cependant la transparence des films s'est trouvée être détériorée lorsque la concentration en agent antimicrobien augmente. En outre, il a été prouvé que des films de polyéthylène basse densité avec un revêtement de méthylcellulose/hydroxypropylméthylcellulose contenant de la nisine deviennent difficiles à sceller thermiquement [Cooksey, 2000]. Dobias et al., 2000 ont également dénoté des différences significatives concernant les propriétés des films polyéthylène contenant différents agents antimicrobiens incluant de l'anhydride benzoïque, de l'éthylparabène ou du propylparabène de 0,5% à 1%. Il a notamment été mesuré que la résistance à la rupture et la perméabilité à la vapeur et à l'oxygène étaient plus basses quel que soit l'antimicrobien incorporé. Au contraire, le coefficient de friction est augmenté. Des tendances similaires ont été observées par Park et al., 2004 et Sayanjali et al., 2011 qui ont mesuré une diminution de la contrainte à la rupture et du pourcentage d'élongation lorsque la concentration en agents antimicrobiens que sont le lysozyme et le sorbate de potassium augmente. Au contraire, Ko et al., 2001 ont démontré que la contrainte à la rupture du film composé de protéines de lactosérum augmente lorsque la nisine y est incorporée. Ceci est expliqué par les interactions électrostatiques qui existent entre les molécules de nisine et les protéines formant le réseau matriciel du film.

5.2 Facteurs influençant l'efficacité d'un conditionnement actif antimicrobien utilisant un mécanisme de diffusion

La libération d'agents antimicrobiens à partir des films exerce une influence significative sur l'efficacité antimicrobienne. Par conséquent, l'évaluation du taux de libération en parallèle avec la détermination de l'activité antimicrobienne permet d'optimiser le développement de films pour prolonger la durée de vie des produits. L'étude et la compréhension de la cinétique de libération de l'agent antimicrobien sont donc essentielles afin d'obtenir un conditionnement actif antimicrobien [Han, 2000].

5.2.1 Compatibilité et interactions agent antimicrobien – film polymérique

Les constituants utilisés lors du processus de fabrication du conditionnement ainsi que les constituants du produit peuvent affecter l'activité de l'agent antimicrobien [Suppakul et al., 2003].

➤ Affinité chimique

La diffusion de l'agent antimicrobien au sein de la matrice polymérique est un facteur important car il conditionne l'efficacité antimicrobienne au sein du produit. En effet, la libération des antimicrobiens à partir des films polymériques doit permettre de maintenir une concentration au-dessus de la concentration minimale inhibitrice au sein du produit à conserver [Han, 2000]. Or, pour un même agent antimicrobien, les résultats sur différentes natures de films ne sont pas semblables car l'affinité chimique entre le conservateur et la matrice joue un rôle déterminant sur la cinétique de libération de l'agent antimicrobien vers le produit. Vojdani et Torres, 1989 ont par exemple mesuré la diffusion du sorbate de potassium pour différentes natures de matrices, à savoir le méthylcellulose et le chitosane. Il a été prouvé que la perméabilité de l'agent antimicrobien était jusqu'à 2 fois plus importante avec une matrice de chitosane par rapport au méthylcellulose. Weng et Chen, 1997 ont notamment démontré que l'anhydride d'acide sorbique incorporé dans les films de polyéthylène est plus efficace pour l'inhibition de moisissures avec une croissance lente telle que les espèces de *Penicillium* plutôt que sur les moisissures ayant une croissance rapide telle que *Aspergillus niger*. Cela est expliqué par une diffusion lente de l'acide sorbique au sein du polyéthylène entraînant une atteinte de la concentration minimale inhibitrice tardive. Weng et Hotchkiss, 1993 ont quant à eux prouvé que des films de polyéthylène basse densité contenant 1% d'acide sorbique sont inefficaces contre la croissance des moisissures contrairement aux résultats obtenus pour l'ajout d'acide sorbique seule en solution qui démontre une efficacité. De la même façon, les résultats de Devlieghere et al., 2000 démontrent que des films de polyéthylène basse densité contenant 5% de sorbate de potassium ne permettent pas d'empêcher la croissance des micro-organismes. Ces résultats sont expliqués par la migration limitée des agents antimicrobiens polaires dans l'eau probablement à cause de l'incompatibilité avec la matrice polyoléfine apolaire. Pour preuve il est possible de citer les travaux de Weng et Hotchkiss, 1993 qui montrent que les anhydrides ont davantage d'affinités avec le polyéthylène que leurs acides libres ou sels correspondants à cause de leur polarité moins élevée et de leur masse molaire plus importante. En effet, l'incorporation d'anhydrides tel que l'anhydride benzoïque dans des films de PE permet de supprimer totalement la croissance de *Rhizopus toxicarius* contrairement aux mêmes expérimentations avec l'acide benzoïque qui n'est pas libéré du film à une vitesse suffisante pour atteindre la concentration minimale inhibitrice [Weng et Hotchkiss, 1993]. Il a également été mesuré que l'anhydride benzoïque est rapidement hydrolysé en acide benzoïque ce qui suggère que l'inhibition de croissance est due à l'acide benzoïque plutôt qu'à l'anhydride lui-même [Weng et Hotchkiss, 1993]. Ko et al., 2001 ainsi que Leung et al., 2002 ont quant à eux démontré que l'affinité entre la nisine et la matrice polymérique influence l'activité antimicrobienne sur *Listeria monocytogenes*. En effet, l'agent antimicrobien est davantage actif dans un film plus hydrophobe. Ceci peut être expliqué par le fait que la nisine amphiphile a une tendance hydrophobe légèrement plus marquée basée sur son interaction avec les membranes cytoplasmiques la rendant ainsi plus active dans des matrices hydrophobes [Winkowski et al. 1994].

➤ Interactions électrostatiques

Des interactions entre l'agent antimicrobien et la matrice polymérique sont possibles lorsque les charges sont opposées. En effet, il a été prouvé par Wong et al., 1996 que la libération de l'acide ascorbique est 4 fois plus élevée que celle de son sel de sodium à 23°C pour une matrice d'alginate de calcium. Ces résultats suggèrent que l'état de protonation de la molécule impacte le processus de diffusion de l'agent antimicrobien de par des interactions électrostatiques avec la matrice. De la même façon, Coma et al., 2001 ont prouvé que l'introduction d'acide stéarique dans des films d'hydroxypropylméthylcellulose contenant de la nisine diminuait l'efficacité antimicrobienne. Ceci peut être expliqué par des interactions électrostatiques entre la nisine cationique et l'acide stéarique anionique ce qui ralentit la libération de l'agent antimicrobien vers le milieu externe.

5.2.2 Interaction agent antimicrobien – constituants de la formulation

Les caractéristiques du produit telles que le pH, l'activité de l'eau, ainsi que sa composition affectent la cinétique de libération de l'agent antimicrobien à partir du film.

➤ Effet du pH

Le pH influe de manière significative sur la cinétique de libération des agents antimicrobiens inclus dans une matrice. En effet, les travaux de Rico Pena et Torres, 1991 démontrent que la diffusion de l'acide sorbique hors du film de méthylcellulose et d'acide palmitique augmente de 36 fois lorsque le pH augmente de 3 à 7. Liu et Hansen, 1990 ont démontré que des valeurs de pH faibles favorisent la migration de l'agent antimicrobien à partir du film. En effet, à pH=3,5 une concentration plus importante de nisine est détectée au sein du milieu de libération. L'explication proposée est reliée au fait que la nisine est davantage soluble à pH acide. Rossi-Márquez et al., 2009 ont également démontré que le pH du milieu externe influençait de manière significative la libération de nisine. En effet, à pH=7 inférieur au point isoélectrique de la nisine qui est de 10, il n'y a qu'une faible fraction qui est libérée puisque l'agent antimicrobien est chargée positivement et interagit avec les protéines du film chargées négativement (pI=4,2-5,3). A pH=4, la nisine démontre une répulsion électrostatique avec le film de protéines puisque les deux molécules ont une charge positive nette, ce qui favorise la libération de nisine au sein de la solution aqueuse externe. Les travaux d'Appendini et Hotchkiss, 1997 démontrent quant à eux que les liaisons covalentes entre le lysozyme et les sulfonates d'esters présents dans l'alcool polyvinylique sont perdues par hydrolyse pour une valeur de pH de 6,24 résultant en une diminution de l'efficacité antimicrobienne. Au contraire, d'autres auteurs tels que Choi et al., 2005 et Chen et al., 1996 ne démontrent pas de différence concernant la libération en fonction du pH de la formulation externe.

➤ Effet de l'activité de l'eau

La valeur de l'activité de l'eau représente un paramètre impactant les cinétiques de diffusion des agents antimicrobiens contenus dans les films. Rico Pena et Torres, 1991 ont démontré que pour des films constitués de méthylcellulose et d'acide palmitique, la perméabilité du sorbate de potassium augmente de $2,3 \cdot 10^{-18}$ (mg/sec.cm²)(cm)/(mg/mL) à $2 \cdot 10^{-8}$ (mg/sec.cm²)(cm)/(mg/mL) lorsque l'activité de l'eau a_w augmente de 0,65 à 0,8. La même tendance a été observée dans les travaux de Vojdani et Torres, 1989. En effet, les résultats ont démontré qu'une diminution de l'activité de l'eau de 1 à 0,77 engendre une diminution de la perméabilité des films de chitosane résultant en une augmentation de la durée de protection de 6 jours à 1.5 mois à 24°C. De la même façon, Devlieghere et al., 2004 ont également mesuré qu'une diminution de l'activité de l'eau par ajout de 1% de chlorure de sodium permet d'obtenir une réduction de croissance de *Candida lambica* pendant 10 jours grâce à un film à base de chitosane, contrairement à la formulation ne contenant pas de chlorure de sodium.

➤ Effet de la composition du milieu externe

La composition du milieu externe impacte la cinétique de libération de l'agent antimicrobien à partir du film. Les différentes interactions entre les agents antimicrobiens et les produits donnent parfois lieu à des phénomènes complexes comme le démontrent les travaux Ouattara et al., 2000a et b. En effet, il a été mesuré que l'acide propionique est presque entièrement libéré de la matrice de chitosane en 48h alors que la libération d'acide acétique est davantage limitée avec jusqu'à 22% d'acide restant dans la matrice après un contact de 168h avec de la viande [Ouattara et al., 2000a]. Au contraire, une étude précédente a prouvé que l'acide acétique diffuse plus rapidement hors du chitosane que l'acide propionique, mais cette fois en milieu aqueux [Ouattara et al., 2000b]. Des interactions différentes entre les composants de la formule externe et les agents antimicrobiens expliquent ces cinétiques de libération opposées. Chung et al., 2001 ont également prouvé que la libération d'agent antimicrobien au sein du produit est gouvernée par la composition de ce dernier. En effet, il a été mesuré que la libération du propylparabène intégré dans un film cellulosique est 3 à 4 fois plus importante lorsqu'il est rajouté 10% d'éthanol en solution aqueuse externe. De plus, il a été mesuré que la libération de l'agent antimicrobien est instantanée lorsque le milieu est constitué de 50% d'éthanol ou de 100% d'heptane. De la même façon, Dobias et al., 2000 ont démontré que des films de polyéthylène contenant de l'anhydride benzoïque connaissent une modification de la cinétique de libération avec une libération deux fois plus importante en présence d'eau dans le milieu externe contrairement à l'huile d'olive.

5.2.3 Effet de l'épaisseur de couche déposée

Rossi-Márquez et al., 2009 ont démontré que des films fins démontrent un relargage plus important de la nisine qui doit parcourir une distance plus faible afin de rejoindre le milieu aqueux externe. Dawson et al., 2003 ont par exemple mesuré que la libération de nisine à partir d'un film de protéine de lactosérum dans l'eau à 35°C pendant 48h était retardée pour des films de 0,57mm d'épaisseur comparée à 0,27mm. Mastromatteo et al., 2009 ont mesuré que la libération de thymol dans des films à base de zéine diminue avec l'épaisseur de couche variant de 120µm à 260µm pour des films monocouches et de 360µm à 500µm pour des films bicouches. Ces résultats sont cohérents par rapport à la diffusion de l'actif au sein d'une matrice polymérique dont la cinétique pour rejoindre le milieu extérieur est fonction de la distance à parcourir (voir aussi *Partie bibliographique - Chapitre I, section 4.4.3 Influence de la taille des microparticules* ; Yang et al., 2001 ; Zhang et al., 2005).

5.2.4 Effet de la température

Il a été prouvé que la température accélère la cinétique de libération de l'agent antimicrobien à partir du film. Wong et al., 1996 ont prouvé que la diffusion de sorbate de potassium, d'ascorbate de sodium et d'acide ascorbique au sein de matrices de calcium alginate est jusqu'à deux fois plus élevée pour des températures variant de 8 à 23°C. Vojdani et Torres, 1989 ont également démontré que la perméabilité du film augmente lorsque la température est plus importante avec une valeur 2,5 fois plus grande pour 24°C par rapport à 5°C pour une matrice de chitosane. Ainsi les produits seront protégés sur une durée plus longue de 1,5 mois à 3,5 mois pour 24 et 5°C respectivement. Chen et al., 1996 ont également démontré que la libération de benzoate de sodium en 30 minutes à 25°C est égale à 57-65%. A 4°C 38 à 39% seulement sont obtenus en 30 minutes démontrant ainsi une baisse de la cinétique de libération lorsque la température diminue. Choi et al., 2005 ont également mesuré que la cinétique de libération du sorbate de potassium introduit au sein de films antimicrobiens à base de κ -carraghénine diminue de $4.24 \times 10^{-13} \text{m}^2/\text{s}$ à $1.29 \times 10^{-13} \text{m}^2/\text{s}$ avec pour une diminution de température de 40°C à 5 °C. Un ralentissement de la libération peut être un atout pour une protection sur le long terme comme démontré par Mauriello et al., 2005 qui ont mesuré qu'un film à base de nisine maintient son efficacité antimicrobienne à 4°C mais pas à 25°C durant 50 heures de conservation.

6. Tests permettant de démontrer l'efficacité des conditionnements actifs antimicrobiens

Il n'existe pas de méthode standard afin de déterminer l'efficacité d'un conditionnement actif antimicrobien. L'activité antimicrobienne des conditionnements fonctionnalisés est mesurée de par plusieurs techniques à savoir : les milieux gélosés sur plaques et la méthode par

agitation en flacon, utilisant toutes un protocole similaire à celui appliqué pour les agents antimicrobiens seuls [Ochs, 2000 ; Davidson and Parish, 1989].

6.1 Méthode des milieux gélosés sur plaque

Dans la méthode des milieux gélosés sur plaque, le film antimicrobien est placé sur un milieu d'agar solide contenant la souche microbienne à tester [Han et Floros, 1997 ; Ha et al., 2001 ; Vartianen et al., 2003]. Les plaques sont incubées jusqu'à ce que la croissance soit visible. Une zone claire autour du film indique une diffusion antimicrobienne depuis le film et une inhibition de la croissance des germes (figure BIII.4). Une inhibition observée en dessous du film testé doit être corrélée avec un contrôle négatif afin de vérifier que cette absence de croissance ne soit pas simplement due au manque d'oxygène. Cette méthode peut être quantitative si le diamètre des zones claires autour des films est mesuré.

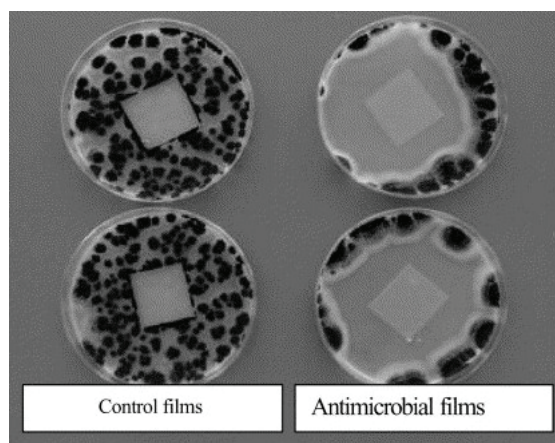


Figure BIII.4. Effet d'un conditionnement antimicrobien sur *Aspergillus niger* mesuré par la méthode des milieux gélosés [Appendini et Hotchkiss, 2002].

6.2 Méthode par agitation en flacon

La méthode par agitation en flacon utilise un milieu de croissance liquide contenant le micro-organisme à étudier et le polymère antimicrobien est incubé avec une agitation légère qui améliore le contact entre le polymère antimicrobien et les cellules de micro-organismes [Shearer et al., 2000 ; Paik et al., 1998 ; Rao et al., 2010 ; Cho et al., 2000 ; Chi-Zhang et al., 2004]. Des échantillons sont prélevés et analysés à intervalle de temps réguliers. Ainsi, cette méthode permet de mesurer une réduction du taux de croissance. Dans cette technique de mesure le ratio de la surface fonctionnalisée/volume du milieu incubateur doit être pris en considération et peut avoir une influence directe sur les résultats. En effet, Soares et Hotchkiss, 1998 ont démontré qu'une augmentation de la surface fonctionnalisée par rapport au volume de libération augmente l'activité antimicrobienne de par une concentration en agent

antimicrobien résultante plus importante. Du point de vue de la méthode, des surfaces fonctionnalisées importante par rapport au volume peuvent sembler être adéquates notamment pour éviter d'atteindre le seuil de sensibilité des appareils de mesure considérés. Néanmoins, cette technique ne reflète pas les conditions réelles de l'application du conditionnement et ne peut donc pas être appliquée. De plus, de par l'agitation légère appliquée, ce test n'est pas représentatif du degré d'agitation que les produits conditionnés subiront et des études supplémentaires pourraient permettre de simuler le comportement antimicrobien pendant le transport et le stockage. En outre, avec les différents procédés de modifications de films, il existe une possibilité pour les microbes de ne pas être tués mais seulement liés à la surface du film par des interactions hydrophobes ou électrostatiques ce qui implique qu'ils ne seront pas détectés dans le milieu liquide.

Conclusion

Les emballages actifs en général et ceux antimicrobiens en particulier ont la capacité de modifier la composition du produit emballé ou de son environnement afin d'améliorer ses propriétés et de prolonger sa durée de vie. Plusieurs techniques peuvent être envisagées afin de développer des conditionnements primaires antimicrobiens allant de l'introduction directe d'agents antimicrobiens au sein des matrices polymériques à leur adsorption ou leur immobilisation en surface. Ces emballages actifs antimicrobiens représentent une technologie prometteuse car ils viennent renforcer l'action conservatrice de la formulation à des endroits ciblés sensibles à la contamination. Ainsi l'utilisation de conditionnements actifs antimicrobiens permet de réaliser des produits allégés en conservateurs répondant à la demande croissante des consommateurs ainsi qu'à une législation en perpétuelle évolution restrictive.

De nombreux travaux de recherche tentent aujourd'hui de mettre en œuvre ces emballages antimicrobiens. Malgré l'intense activité de recherche, peu de réalisations concrètes de conditionnements actifs sont réellement disponibles sur les marchés européens dont la France. De plus, les applications se situent majoritairement dans le domaine agro-alimentaire. Le projet Stabipack se positionne donc sur un marché en plein développement sujet à de nombreuses perspectives d'avenir.

Références

- [Ahvenainen, 2003] Ahvenainen R., 2003.. Novel food packaging techniques. CRC Press LLC, Boca Raton, Finlande.
- [Al-Nabulsi et al., 2006] Al-Nabulsi A.A., Han J.H., Liu Z., Rodrigues-Vieira E.T., Holley R.A. 2006. Temperature-Sensitive Microcapsules Containing Lactoferrin and Their Action Against *Carnobacterium viridans* on Bologna. *J. Food Sci.*, 71, M208-M214.
- [An et al., 2000] An D., Kim Y., Lee S., Paik H., Lee D., 2000. Antimicrobial low density polyethylene film coated with bacteriocins in binder medium, *Food Sci. Biotechnol.*, 9, 14–20
- [Appendini et Hotchkiss, 1997] Appendini P., Hotchkiss J., 1997. Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films, *Packag. Technol. Sci.*, 10, 271–279
- [Appendini et Hotchkiss, 2002] Appendini P., Hotchkiss J.H., 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 3, 113–126.
- [Appendini et Hotchkiss, 2002] Appendini P., Hotchkiss J.H., 2002. Review of antimicrobial food packaging, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 3, 113–126.
- [Arcan et Yemenicioğlu, 2013] Arcan I., Yemenicioğlu A., 2013. Development of flexible zein–wax composite and zein–fatty acid blend films for controlled release of lysozyme, *Food Res. Int.*, 51, 208–216
- [Begin et Calsteren, 1999] Begin A., Calsteren M.R.V., 1999. Antimicrobial films produced from chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 26, 63–7.
- [Benech et al., 2002] Benech R.O., Kheadr E.E., Laridi R., Lacroix C., Fliss I., 2002. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture, *Appl. Environ. Microb.*, 68, 3683–3690.
- [Bilyk et al., 2008] Bilyk A., Li S., Murphy J., Petinakis S., Zerdin K., Scully A., 2008. Photoactive nanocoating for controlling microbial proliferation on polymeric surfaces, *Prog. Org. Coat.*, 62, 40–48.
- [Bleasel et al., 2002] Bleasel N., Tate B., Rademaker M., 2002. Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils, *Austral. J. Dermatol.*, 43, 211–213.
- [Brody et al., 2001] Brody A.L., Strupinsky E.R., Kline, L.R., 2001. Active packaging for food applications. Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc. 218 pages.
- [Brower et al., 1995] Bower C.K., McGuire J., Daeschel M.A., 1995. Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 992–997.

- [Butler, 2002] Butler B.L., 2002. Cryovac® OS2000TM Polymeric oxygen scavenging systems. World Conference on Packaging: Proceedings of the 13th Intl. Assoc. of Packaging Res. Inst., Michigan State Univ., East Lansing, Mich., June 23-28. Fla.: CRC Press LLC., 157–62.
- [Cagri et al., 2001] Cagri A., Ustunol Z., Ryser E.T., 2001. Antimicrobial, mechanical and moisture barrier properties of low pH whey protein based edible films containing paminobenzoic or sorbic acids, *J. Food Sci.*, 66, 865–870.
- [Catalá et Gavara, 2001] Catalá R., Gavara R., 2001. Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados. *Arbor CLXVIII*, 661 109-127.
- [Cha et al., 2001] Cha D., Park H., Cooksey K., 2001. Preparation and diffusion rate of a nisin incorporated antimicrobial film. IFT Annual Meeting Technical Program, New Orleans. Book of Abstracts, Chicago.
- [Cha et al., 2003] Cha D.S., Chen J., Park H.J., Chinnan M.S., 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in tofu by use of a polyethylene film coated with a cellulosic solution containing nisin, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 38, 499–503.
- [Chen et al., 1996] Chen M.C., Yeh G.H.C., Chiang B.H., 1996. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative, *J. Food Proc. Preserv.*, 20, 379 – 390.
- [Chen et al., 1999] Chen M.J., Weng Y.M., Chen W.L., 1999. Edible coating as preservative carriers to inhibit yeast on Taiwanese-style fruit preserves, *J. Food Safety*, 19, 89–96.
- [Chi-Zhang et al., 2004] Chi-Zhang Y., Yam K.L., Chikindas M.L., 2004. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system, *Int. J. Food. Microbiol.*, 90, 15–22.
- [Chi-Zhang et al., 2004] Chi-Zhang Y., Yam K.L., Chikindas M.L., 2004. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system, *Int. J. Food Microbiol.*, 90, 15–22
- [Cho et al., 2000] Cho Y.W., Han S.S., Ko S.W., 2000. PVA containing chito-oligosaccharide side chain, *Polymer*, 41, 2033–2039.
- [Choi et al., 2005] Choi J.H., Choi W.Y., Cha D.S., Chinnan M.J., Park H.J., Lee D.S., Park J.M., 2005. Diffusivity of potassium sorbate in κ -carrageenan based antimicrobial film, *LWT-Food Sci. Technol.*, 38, 417–423.
- [Chung et al., 2001] Chung D., Papadakis S.P., Yam K.L., 2001. Release of propyl paraben from a polymer coating into water and food simulating solvents for antimicrobial packaging applications, *J. Food Processing Preservation*, 25, 71–87.

- [Cichello, 2015] Cichello S.A., 2015. Oxygen absorbers in food preservation: a review, *J. Food Sci. Technol.*, 52, 1889–1895.
- [Cohen et al., 1995] Cohen J.D., Erkenbrecher C.W., Haynie S.L., Kelley M.J., Kobsa H., Roe A.N., Scholla M.H., 1995. Process for preparing antimicrobial polymeric materials using irradiation. U.S. Patent 5428078.
- [Coma et al., 2001] Coma V., Sebti I., Pardon P., Deschamps A., Pichavant F.H., 2001. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*, *J. Food Protec.*, 64, 470–475.
- [Coma et al., 2002] Coma V., Martial-Gros A., Garreau S., Copinet A., Deschamps A., 2002. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix, *J. Food Sci.*, 67, 1162–1169.
- [Conte et al., 2006a] Conte A., Buonocore G.G., Bevilacqua A., Sinigaglia M., Del Nobile M.A., 2006. Immobilization of lysozyme on polyvinylalcohol films for active packaging applications, *J. Food Protect.*, 69, 866–870.
- [Conte et al., 2006b] Conte A., Sinigaglia M., Del Nobile M.A., 2006. Antimicrobial effectiveness of lysozyme immobilized on polyvinylalcohol-based film against *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *J. Food Protect.*, 69, 861–865.
- [Cooksey, 2000] Cooksey K. 2000. Utilization of antimicrobial packaging films for inhibition of selected microorganism. S.J. Risch (Ed.), *Food packaging: Testing methods and applications*, American Chemical Society, Washington, DC, 2754–2757.
- [da Silva Paula et al., 2009] da Silva Paula M.M., Franco C.V., Baldin M.C., Rodrigues L., Barichello T., Savi G.D., Bellato L.F., Fiori M.A., da Silva L., Bellato L.F., Fiori M.A., Silva L. da, 2009. Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C*, 29, 647–650.
- [Darmadji et Izumimoto, 1994] Darmadji P., Izumimoto M., 1994. Effect of chitosan in meat preservation, *Meat Sci.*, 38, 243–254.
- [Davidson et Parish, 1989] Davidson P.M., Parish M.E., 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, 431, 148–155
- [Dawson et al., 2002] Dawson P.L., Carl G.D., Acton J.C., Han I.Y., 2002. Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna, *Poultry Sci.*, 81, 721–726
- [Dawson et al., 2003] Dawson P.L., Hirt D.E., Rieck J.R., Acton J.C., Sotthibandhu A., 2003. Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method, *Food Res. Int.*, 36, 959–968.

[De Kruijf et al., 2002] De Kruijf N., van Beest M., Rijk R., Sipilainen-Malm T., Paseiro Losada P., De Meulenaer B., 2002. Active and intelligent packaging: Applications and regulatory aspects, *Food Addit. Contam.*, 19, 144–162.

[De Leiris, 1994] De Leiris, J.P., les emballages actifs, nouvelle approche pour améliorer la préservation des aliments, la lettre scientifique de l'Institut française pour la nutrition, Tec & Doc, 1994, 28, 2–14.

[Degnan et Luchansky, 1992] Degnan A.J., Luchansky J.B., 1992. Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocin AcH and liposome-encapsulated pediocin AcH, *J. Food Protect.*, 55, 552–554.

[Del Nobile et al., 2004] Del Nobile M.A., Cannarsi M., Altieri C., Sinigaglia M., Favia P., Iacoviello G., D'Agostino R., 2004. Effect of Ag-containing nanocomposite active packaging system on survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *J. Food Sci.*, 69, 379–383

[Delves-Broughton, 1990] Delves-Broughton J., 1990. Nisin and its application as a food preservative, *J. Soc. Dairy Technol.*, 43, 73–76.

[Devlieghere et al., 2000] Devlieghere F., Vermeiren L., Jacobs M., Debevere J., 2000. The effectiveness of hexamethylene tetramine – incorporated plastic for the active packaging of foods, *Packag. Technol. Sci.*, 13, 117–121.

[Devlieghere et al., 2004] Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J., 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food Microbiol.*, 21, 703–714.

[Dobias et al., 2000] Dobias J., Chudackova K., Voldrich M., Marek M., 2000. Properties of polyethylene films with incorporated benzoic anhydride and/or ethyl and propyl esters of 4-hydroxybenzoic acid and their suitability for food packaging, *Food Add. Contamin.*, 17, 1047–53.

[Dubas et al., 2006] Dubas S.T., Kumlangdudsana P., Potiyaraj P., 2006. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 289, 105–109.

[Dutta et al., 2009] Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K., Dutta J., 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food Chemistry*, 114, 1173–1182.

[Eswaranandam et al., 2004] Eswaranandam S., Hettiarachchy N.S., Johnson M.G., 2004. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella gaminara*, *J. Food Sci.*, 69, 79–84.

- [Fatih et al., 2009] Fatih Y.G., Yener F.Y., Yemenicioglu A., 2009. Antimicrobial activity of lactoperoxidase system incorporated into cross-linked alginate films, *J. Food Sci.*, 74, 73–79.
- [Flores et al., 2007] Flores S., Haedo A.S., Campos C., Gerschenson L., 2007. Antimicrobial performance of sorbates supported in a tapioca starch edible film, *Eur. Food Res. Technol.*, 225, 375–384.
- [Floros et al., 1997] Floros J.D., Dock L.L., Han J.H., 1997. Active packaging technologies and applications, *Food Cosmet. Drug Packaging*, 20, 10–17.
- [Franklin et al., 2004] Franklin N.B., Cooksey K.D., Getty K.J.K., 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the surface of individually packaged hot dogs with a packaging film coating containing nisin, *J. Food Protect.*, 67, 480–485.
- [Ghosh et al., 2010] Ghosh S., Kaushika R., Nagalakshmi K., Hoti S.L., Menezes G.A., Harish B.N., Vasan H.N., 2010. Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar-agar matrix as a thin film, *Carbohydrate Res.*, 345, 2220–2227.
- [Goldberg et al., 1990] Goldberg S., Doyle R.J., Rosenberg M., 1990. Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *J. Bacteriol.*, 172, 5650–5654.
- [Gontard, 2000] Gontard N., 2000. Les emballages actifs. Ed. TEC & DOC/Lavoisier. 264 pages.
- [Grower et al., 2004] Grower J.L., Cooksey K., Getty K.J.K., 2004. Development and characterization of an antimicrobial packaging film coating containing nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*, *J. of Food Protect.*, 67, 475–479.
- [Guerra et al., 2005] Guerra N.P., Macias C.L., Agrasar A.T., Castro L.P., 2005. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin as biopreservative agent, *Lett. Appl. Microbiol.*, 40, 106–1610.
- [Guiga et al., 2009] Guiga W, Galland S, Peyrol E, Degraeve P, Carnet-Pantiez A, Sebti I. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10, 203–207.
- [Guillard et al., 2009] Guillard V., Issoupov V., Redl A. and Gontard N., 2009. Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10, 108–115.
- [Ha et al., 2001] Ha J.U., Kim Y.M., Lee D.S., 2001. Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef, *Packag. Technol. Sci.*, 15, 55–62.

- [Han et Floros, 1997] Han J.H., Floros J.D., 1997. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *J. Plastic Film Sheeting*, 13, 287–298.
- [Han et Floros, 1999] Han J.H., Floros J.D., 1999. Modeling antimicrobial activity loss of potassium sorbate against Baker's yeast after heat process to develop antimicrobial food packaging materials, *Food Sci. Biotechnol.*, 8, 11–4.
- [Han, 2000] Han J.H., 2000. Antimicrobial food packaging. *J. Food Technol.*, 54, 56–65.
- [Hoffman et al., 2001] Hoffman K.L., Han I.Y., Dawson P.L., 2001. Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid and EDTA, *J. Food Protect.*, 64, 885–889.
- [Hong et al., 2009] Hong Y., Lim G., Song K.B., 2009. Physical properties of Gelidium corneum-gelatin blend films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins, *J. Food Sci.*, 74, 6–10.
- [Hong et Bielory, 2009] Hong J., Bielory L., 2009. Allergy to ophthalmic preservatives, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 9, 447–453.
- [Hong et Bielory, 2009] Hong J., Bielory L. 2009. Allergy to ophthalmic preservatives, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 9, 447–453.
- [Imran et al., 2010] Imran M., El-Fahmy S., Revol-Junelles A., Desobry S., 2010. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films, *Carbohydrate Polymers*, 81, 219–225.
- [Imran et al., 2012] Imran M., Revol-Junelles A.M., Rene N., Jamshidian M., Akhtar M.J., Arab-Tehrany E., Jacquot M., Desobry S., 2012. Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films, *Food Hydrocolloids*, 29, 407–419.
- [Imran, 2011] Imran M., 2011. Enrobages actifs contenant des peptides antimicrobiens nano-vectorisés. Thèse de doctorat. Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- [Ishitani, 1995] Ishitani T., 1995. Active Packaging for food quality preservation in Japan, P. Ackermann, M. Jaegerstaad, T. Ohlsson (Eds.), *Foods and Packaging Materials—Chemical Interactions*, Royal Society of Chemistry, Letchworth, UK, 177–188.
- [Kim et al., 2002] Kim Y.-M., Paik H.-D., Lee D.-S., 2002. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film, *J. Sci. Food Agr.*, 82, 998–1002.
- [Klaenhammer, 1993] Klaenhammer T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbial Review*, 12, 39–86.

[Ko et al., 2001] Ko S., Janes M.E., Hettiarachchy N.S., Johnson M.G., 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Sci.*, 66, 1006–1011.

[Kourai et al., 1994] Kourai H., Manabe Y., Yamada Y., 1994. Mode of bactericidal action of zirconium phosphate ceramics containing silver ions in the crystal structure, *J. Antibact. Antifung. Agents*, 22, 595–595.

[Ku et Song, 2007] Ku K., Song K.B., 2007. Physical properties of nisin-incorporated gelatin and corn zein films and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 520–523.

[Labuza et Breene, 1989] Labuza T. P., Breene W., 1989. Application of 'active packaging' technologies for the improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods, *Bibliotheca nutritio et dieta*, 43, 252–259.

[Labuza, 1996] Labuza T.P., 1996. An introduction to active packaging for foods, *Food Technol.*, 50, 68–71.

[Lee et al., 2003] Lee C.H., An D.S., Park H.J., Lee D.S., 2003. Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating, *Packag. Technol. Sci.*, 16, 99–106.

[Lemay et al., 2002] Lemay M.J., Choquette J., Delaquis P.J., Gariépy C., Rodrigue N., Saucier L., 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model, *Int. J. Food Microbiol.*, 78, 217–226.

[Leung et al., 2002] Leung P.P., Yousef A.E., Shellhammer T.H., 2002. Antimicrobial properties of nisin-coated polymeric films as influenced by film type and coating conditions, *J. Food Safety*, 23, 1–12.

[Liu et Hansen, 1990] Liu W., Hansen N., 1990. Some chemical and Physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2551–2558.

[Loertzer et al., 2006] Loertzer H., Soukup J., Hamza A., Wicht A., Rettkowski O., Koch E., Fornara P., 2006. Use of catheters with the AgION antimicrobial system in kidney transplant recipients to reduce infection risk, *Transplant. Proc.*, 38, 707–710.

[Lövenklev et al., 2004] Lövenklev M., Artin I., Hagberg O., Borch E., Holst E., Rådström P., 2004. Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride, and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2928–2934.

[Lück et Jager, 1997] Lück E., Jager M., 1997. Antimicrobial action of preservatives, *Antimicrob. Food Addit.*, 36–57.

- [Lyver et al., 1998] Lyver A., Smith J.P., Tarte I., Farber J.M., Nattress F.M., 1998. Challenge studies with *Listeria monocytogenes* in a value-added seafood product stored under modified atmospheres, *Food Microbiol.*, 15, 379–389.
- [Mastromatteo et al., 2009] Mastromatteo M., Barbuzzi G., Conte A., Del Nobile M.A., 2009. Controlled release of thymol from zein based film, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10, 222–227.
- [Mauriello et al., 2005] Mauriello G., De Luca E., La Stora A., Villani F., Ercolini D., 2005. Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging, *Lett. Appl. Microbiol.*, 41, 464–469.
- [Mauriello et al., 2005] Mauriello G., De Luca E., La Stora A., Villani F., Ercolini D., 2005. Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging, *Lett. Appl. Microbiol.*, 41, 464–469.
- [Min et al., 2005a] Min S., Harris L., Krochta J., 2005a. Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food Sci.*, 70, 332–338.
- [Min et al., 2005b] Min S., Harris L., Krochta J., 2005b. *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase system, *J. Food Sci.*, 70, 317–324.
- [Min et al., 2005c] Min, S., Harris, L., Krochta, J., 2005c. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate and the lactoperoxidase systems. *J. Food Sci.*, 70, 87–94.
- [Min et al., 2008] Min S., Rumsey T.R., Krochta J.M., 2008. Diffusion of the antimicrobial lysozyme from a whey protein coating on smoked salmon, *J. Food Eng.*, 84, 39–47.
- [Ming et al., 1997] Ming X., Weber G.H., Ayres J.W., Sandine W.E., 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats, *J. Food Sci.*, 62, 413–415.
- [Ming et al., 1997] Ming X., Weber G., Ayres J., Sandine W., 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats, *J. Food Sci.*, 62, 413–415.
- [Mohamed et al., 2013] Mohamed C., Clementine K.A., Didier M., Gérard L., Noëlle D.C.M., 2013. Antimicrobial and physical properties of edible chitosan films enhanced by lactoperoxidase system, *Food Hydrocolloids*, 30, 576–580.
- [Möller et al., 2004] Möller H., Grelier S., Pardon P., Coma V., 2004. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films, *J. Agr. Food Chem.*, 52, 6585–6591.

[Naito et al., 1991] Naito S., Okada Y. Yamaguchi N., 1991. Studies on the behaviour of microorganisms in sponge cake during anaerobic storage, *Packag. Technol. Sci.*, 4, 4333–44.

[Natrajan et Sheldon, 2000a] Natrajan N, Sheldon BW, 2000. Efficacy of nisin coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin, *J. Food Protect.*, 63, 1189–1196.

[Natrajan et Sheldon, 2000b] Natrajan N., Sheldon B.W., 2000. Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein- and polysaccharide-based films containing a nisin formulation, *J. Food Protect.*, 63, 1268–1272.

[Nostro et al., 2012] Nostro A., Scaffaro R., D'Arrigo M., Botta L., Filocamo A., Marino A., Bisignano G., 2012. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities, *Appl. Microbiol. Biot.*, 96, 1029–1038.

[Ochs, 2000] Ochs D., 2000 . Antimicrobials. In: H. Zweifel, *Plastics Additives, Handbook*, 647–680 . Munich, Germany: Hanser.

[Ouattara et al., 2000a] Ouattara B., Simard R.E., Piette G., Bégin A., Holley R.A., 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan, *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 139–148.

[Ouattara et al., 2000b] Ouattara B., Simard R., Piette G., Bégin A., Holley R., 2000. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films, *J. Food Sci.*, 65, 768–772.

[Ozdemir et al., 1999] Ozdemir M., Yurteri C., Sadikoglu H., 1999. Physical polymer surface modification methods and applications in food packaging polymers, *Cr. Rev. Food Sci.*, 39, 457–477.

[Padgett et al., 1998] Padgett T., Han I., Dawson P., Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films, *J. Food Protect.*, 61, 1330–1335.

[Paik et al., 1998] Paik J.S., Dhanasekharan M., Kelly M.J., 1998. Antimicrobial activity of UV-irradiated nylon film for packaging applications, *Packag. Technol. Sci.*, 11, 179–187.

[Park et al., 2004] Park A.-I., Daeschel M.A., Zhao Y., 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films, *J. Food Safety*, 69, 215–221.

[Perrenoud et al., 1994] Perrenoud D., Bircher A., Hunziker T., Suter H., Bruckner-Tuderman L., Stäger J., Thürlimann W., Schmid P., Suard A., Hunziker N., 1994. Frequency of sensitization to 13 common preservatives in Switzerland. *Contact Dermatitis*, 30, 276–279.

- [Perrenoud et al., 1994] Perrenoud D., Bircher A., Hunziker T., Suter H., Bruckner-Tuderman L., Stäger J., Thürlimann W., Schmid P., Suard A., Hunziker N., 1994. Frequency of sensitization to 13 common preservatives in Switzerland. *Contact Dermatitis*, 30, 276–279.
- [Pintado et al., 2009] Pintado C.M.B.S., Ferreira M.A.S.S., Sousa I., 2009. Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*, *J. Food Protect.*, 72, 1891–1896.
- [Pintado et al., 2010] Pintado C.M.B.S., Ferreira M.A.S.S., Sousa I., 2010. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin, *Food Control*, 21, 240–246.
- [Pranoto et al., 2005] Pranoto Y., Rakshit S.K., Salokhe V.M., 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 38, 859–865.
- [Ramos et al., 2012] Ramos M., Jiménez A., Peltzer M., Garrigós M.C., 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging, *J. Food Eng.*, 109, 513–519.
- [Rao et al., 2010] Rao M.S., Kanatt S.R., Chawla S.P., Sharma A., 2010. Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties, *Carbohydrate Polymers*, 82, 1243–1247.
- [Restuccia et al., 2010] Restuccia D., Spizzirri U.G., Parisi O.I., Cirillo G., Curcio M., Iemma F., Puoci F., Vinci G., Picci N., 2010. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications, *Food Control*, 21, 1425–1435.
- [Rhim et al., 2006] Rhim J.W., Hong S.I., Park H.W., Ng P.K.W., 2006. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial properties, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5814–5822.
- [Rico-Pena et Torres, 1991] Rico-Pena D., Torres J., 1991. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects, *J. Food Sci.*, 56, 497–499.
- [Rodrigues et Han, 2000] Rodrigues E.T., Han J.H., 2000. Antimicrobial wheyprotein films against spoilage and pathogenic bacteria, *Proceedings of the IFT Annual Meeting*; Dallas, Tex.; June 10-14. Chicago, Ill.: Institute of Food Technologists. p 191.
- [Rojas-Grau et al., 2007] Rojas-Grau M.A., Avena-Bustillos R.J., Olsen C., Friedman M., Henika P.R., Martin-Belloso O., 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, Barrier and antimicrobial properties of alginate – Apple puree edible films, *J. Food Eng.*, 81, 634–641.

[Romero, 2000] Romero M. V., 2000. Mold growth in stored rice noodles as affected by packaging materials, storage temperature and Negamold. In 29. Annual Convention of the Philippine Society for Microbiology, Inc., Laoag, Ilocos Norte (Philippines), 10–11 May 2000.

[Rossi-Márquez et al., 2009] Rossi-Márquez G., Han J.H., García-Almendárez B., Castaño-Tostado E., Regalado-González C., 2009. Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *J. Sci. Food Agr.*, 89, 2492–2497.

[Salmaso et al., 2004] Salmaso S., Elvassore N., Bertucco A., Lante A., Caliceti, P., 2004. Nisin-loaded poly-L-lactide nano-particles produced by CO₂ anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity, *Int. J. Pharm.*, 287, 163–173.

[Sanla-Ead et al., 2012] Sanla-Ead N., Jangchud A., Chonhenchob V., Suppakul P., 2012. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films, *Packaging Technology and Science*, 25, 7–17.

[Santiago-Silva et al., 2009] Santiago-Silva P., Soares N.F.F., Nóbrega J.E., Júnior M.A.W., Barbosa K.B.F., Volp A.C.P., Zerdas E.R.M.A., Würdlitz N.J., 2009. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham, *Food Control*, 20, 85–89.

[Sayanjali et al., 2011] Sayanjali S., Ghanbarzadeh B., Ghiassifar S., 2011. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios, *LWT – Food Sci. Technol.*, 44, 1133–1138.

[Scanell et al., 2000] Scanell A., Hill C., Ross R., Marx S., Hartmeier W., Arendt E., 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lacticin 3147 and Nisaplin, *Int. J. Food Microbiol.*, 60, 241–249.

[Seydim et Sarikus, 2006] Seydim A.C., Sarikus G., 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils, *Food Res. Int.*, 39, 639–644.

[Shearer et al., 2000] Shearer A.E.H., Paik J.S., Hoover D.G., Haynie S.L., Kelley M.J., 2000. Potential of an antibacterial ultraviolet-irradiated nylon film *Biotechnol. Bioeng.*, 67, 141–146.

[Shirazi et Cameron, 1992] Shirazi A., Cameron A.C., 1992, Controlling relative humidity in modified atmosphere packages of tomato fruit, *HortScience*, 27, 336–339.

[Siragusa et Dickinson, 1992] Siragusa G.R., Dickinson J.S., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium gel, *J. Food Sci.*, 57, 293–296.

- [Smith et al., 1987] Smith J.P., Ooraikul B., Koersen W.J., van de Voort F.R., Jackson E.D., Lawrence R.A., 1987. Shelf-life extension of a bakery product using ethanol vapor, *Food Microbiol.*, 4, 329–337.
- [Smith et al., 1990] Smith J.P., Ramaswamy H.S., Simpson B.K., 1990. Developments in food packaging technology. Part II. Storage aspects, *Trends Food Sci. Tech.*, 1, 111–118.
- [Smith et al., 1995] Smith J.P., Hoshino J., Abe Y., 1995. Interactive packaging involving sachet technology. In: Rooney ML, editor. *Active food packaging*. Glasgow: Blackie Academic and Professional. 143–73.
- [Soares et Hotchkiss, 1998] Soares N., Hotchkiss J., 1998. Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging, *Packag. Technol. Sci.*, 11, 9–18.
- [Sorrentino et al., 2007] Sorrentino A., Gorrasi G., Vittoria V., 2007. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications, *Trends Food Sci. Tech.*, 18, 84–95.
- [Suppakul et al., 2003] Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger S.W., 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.*, 68, 408–420.
- [Vartiainen et al., 2003a] Vartiainen J., Skytta E., Ahvenainen-Ranta R., Enqvist J., 2003. Antimicrobial and barrier properties of LDPE films containing Imazalil and EDTA, *J. Plast. Film Sheeting*, 19, 249–261.
- [Vartiainen et al., 2003b] Vartiainen J., Skytta E., Enqvist J., Ahvenainen R., 2003. Properties of antimicrobial plastics containing traditional food preservatives, *Packag. Technol. and Sci.*, 16, 223–229.
- [Vartiainen et al., 2005] Vartiainen J., Ratto M., Paulussen S., 2005. Antimicrobial activity of glucose oxidase-immobilized plasma-activated polypropylene films, *Packag. Technol. Sci.*, 18, 243–251.
- [Vermeiren et al., 1999] Vermeiren L., Devlieghere F., Van Beest M., De Kruijf N., Debevere J., 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Tech.*, 10, 77–86.
- [Vermeiren et al., 2002] Vermeiren L., Devlieghere F., Debevere J., 2002. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts, *Food Addit. Contam.*, 19, 163–171.
- [Vignolo et al., 2000] Vignolo G., Palacios J., Farias M.E., Sesma F., Schillinger U., Holzapfel W., Oliver G., 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system, *Curr. Microbiol.*, 41, 410–416.

[Vojdani et Torres, 1989] Vojdani F., Torres J.A., 1989. Potassium sorbate permeability of polysaccharide films: chitosan, methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose, *J. Food Proc. Eng.*, 12, 33–48.

[Wang et Chio, 1998] Wang S., Chio S., 1998. Reversible immobilization of chitinase via coupling to reversible soluble polymer, *Enzyme Microb. Tech.*, 22, 1998, 634–640.

[Wang et Hsiue, 1993] Wang C., Hsiue G., 1993. Glucose oxidase immobilization onto plasma induced graft copolymerized polymeric membrane modified by poly(ethylene oxide) as a spacer, *J. Appl. Polym. Sci.*, 50, 1141–1149.

[Wei et al., 2011] Wei X., Youngpairoj A.S., Garrido C., Zahonero N., Corral A., de Mendoza C., Heneine W., Johnson J.A., Garcia-Lerma J.G., 2011. Minority HIV mutation detection in dried blood spots indicates high specimen integrity and reveals hidden archived drug resistance, *J. Clin. Virol.*, 50, 148–152.

[Weng et al., 1997] Weng Y.M., Chen M.J., Chen W., 1997. Benzoyl chloride modified ionomer films as antimicrobial food packaging materials, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 32, 229–34.

[Weng et al., 1999] Weng Y.M., Chen M.J., Chen W., 1999. Antimicrobial food packaging materials from poly(ethylene-comethacrylic acid). *Lebensm. Wiss. Technol.* 32, 191–195.

[Weng et Chen, 1997] Weng Y.M., Chen M.J., 1997. Sorbic anhydride as antimycotic additive in polyethylene food packaging films, *Food Sci. Technol.*, 30, 485–487.

[Weng et Hotchkiss, 1993] Weng Y., Hotchkiss J., 1993. Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging, *Packag. Technol. Sci.*, 6, 123–128.

[Weng et Hotchkiss, 1993] Weng Y.M., Hotchkiss J.H., 1993. Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. *Packag. Technol. Sci.* 6, 123–128.

[Wilhoit, 1996] Wilhoit D., 1996. Film and method for surface treatment of foodstuffs with antimicrobial compositions. US Patent 5,573,797.

[Winkowski et al., 1994] Winkowski K., Bruno M.E.C., Montville T.J., 1994. Correlation of bioenergetic parameters with cell death in *Listeria monocytogenes* cells exposed to nisin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4186–4188.

[Wong et al., 1996] Wong D.W.S, Gregorski K.S., Hudson J.S., Pavlath A.E., 1996. Calcium alginate films: Thermal properties and permeability to sorbate and ascorbate, *J. Food Sci.*, 61, 337-341.

[Yang et al., 2001] Yang Y.Y., Chung T.S., Ng N.P., 2001. Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric

microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials*, 22, 231–241.

[Zhang et al., 2005] Zhang J.X., Zhu K.J., Chen D., 2005. Preparation of bovine serum albumin loaded poly (d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres by a modified phase separation technique, *J. Microencapsul.*, 22, 117–126.

Etude expérimentale

Chapitre I:

Détermination des paramètres influençant la morphologie des microsphères de poly(ϵ -caprolactone) et étude des cinétiques de libération résultantes

Chapitre II :

Réalisation de films antimicrobiens contenant des microparticules pour l'obtention d'une forme à libération prolongée

Chapitre III :

Etude du partage de l'alcool phényléthylique au sein d'une émulsion et mesure de l'activité antimicrobienne

Introduction à l'étude expérimentale

Ces trois années de thèse ont suivi une stratégie précise dans le but de répondre aux objectifs du projet. Cette introduction expérimentale vise à détailler le cheminement scientifique adopté afin de comprendre l'origine de chacune des études présentées dans la suite de ce manuscrit et leur positionnement par rapport aux travaux existants.

L'antimicrobien sélectionné pour ce travail est l'alcool phényléthylique qui est le composé majeur de la rose introduit à titre de parfum dans de nombreuses formulations mais qui possède également des propriétés bactériostatiques [Lilley et Brewer, 1953]. Il a été démontré que l'action antimicrobienne de l'alcool phényléthylique est associée à des changements cytologiques incluant une détérioration de la membrane notamment pour les espèces à Grams négatifs [Lucchini et al., 1990 ; Corre et al., 1990]. Ainsi, l'alcool phényléthylique peut être utilisé en tant qu'agent antimicrobien dans les formulations, et ce sans être référencé en tant que conservateur puisqu'il est non listé dans l'Annexe VI de la directive cosmétique Européenne 76/768/CEE, répondant ainsi aux critères du projet Stabipack.

L'objectif du projet est de réaliser un conditionnement actif antimicrobien permettant de protéger le produit pendant sa durée de vie, c'est-à-dire pour une période d'au moins six mois. Pour y répondre, l'alcool phényléthylique a été encapsulé afin de permettre une libération du principe actif contrôlée et prolongée dans le temps [Kumar, 2000 ; Branon-Peppas, 1995]. Des critères concernant les caractéristiques des microparticules antimicrobiennes ont été fixés afin d'assurer une conservation des formules sur des temps longs. En effet, il est établi dans la littérature que la cinétique de libération d'un principe actif est plus rapide pour des particules de petites tailles de par une distance diffusionnelle pour atteindre le milieu extérieur qui diminue [Roy et al., 1992]. Il est donc judicieux de fixer dès le début de l'étude des tailles micrométriques pour les particules afin de maximiser la probabilité d'obtenir une libération sur des temps longs. De la même façon, des microparticules qui seront fortement chargées en principe actif pourraient permettre une libération prolongée dans le temps avec des concentrations suffisantes pour atteindre la concentration minimale inhibitrice de l'agent antimicrobien. Cependant les microparticules doivent conserver une tenue mécanique de résistance à la pression ou aux chocs car leur manipulation se fera dans des milieux agités. Le **premier sujet d'étude** de ce travail a donc été l'obtention de microparticules possédant les caractéristiques préétablies afin de fonctionnaliser le conditionnement primaire. La technique de microencapsulation par évaporation de solvant a été sélectionnée car elle nécessite un matériel usuel et des conditions opératoires douces (température ambiante, pression atmosphérique) [Kim et al., 2005]. Sa mise en place est donc simple et ne requiert pas d'investissements conséquents. Plusieurs natures de polymères ont été sélectionnées pour la matrice des microparticules dont le poly(ϵ -caprolactone) et le polyméthacrylate de méthyle qui ont tous les deux la caractéristique d'être biocompatibles, et donc adaptés pour un usage dans des produits destinés à une application topique [Lemperle et al., 1991 ; Chen et al., 2000]. Les matrices de poly(ϵ -caprolactone) ont démontré des morphologies particulières par rapport aux communes particules lisses. Ces états de surface détériorés ont déjà été observés dans des travaux précédents utilisant la microencapsulation par évaporation de solvant avec ce même polymère. Par exemple, dans les travaux de Suave et al., 2010 ainsi que Dordunoo et al., 1995,

les particules sont caractérisées par le terme « rugueux », tandis que les études de Zhu et al., 2005 et Dubernet et al., 1987 font état respectivement de particules avec des trous importants et des fissures profondes. Trois principales dégradations morphologiques ont été relevées en fonction des paramètres de formulation et du procédé à savoir : des cicatrices et des défauts [Dubernet et al., 1987; Sato et al., 1988; Jalil et Nixon, 1990; Jeong et al., 2003], des particules rugueuses [Suave et al., 2010 ; Dordunoo et al., 1995] ainsi que des états de surface avec des trous [Dordunoo et al., 1995; Perez et al., 2000; Dubernet et al., 1987; Zhu et al., 2005]. Izumikawa et al., 1991 ainsi que Chung et al., 2001 ont démontré que les morphologies détériorées sont obtenues dans le cas d'une évaporation à pression réduite à cause de l'état amorphe de la matrice polymérique. Dubernet et al., 1987 ont quant à eux remarqué que l'état de surface était relié à la taille des microsphères. Cependant, la majorité des études concernant l'encapsulation ne font qu'évoquer ces surfaces endommagées et il n'existe que très peu d'explications quant aux facteurs et phénomènes physico-chimiques responsables. En effet, un état de l'art de la littérature a permis d'établir que la plupart des travaux de microencapsulation sont focalisés sur l'étude de la cinétique de libération du principe actif plutôt que sur la compréhension des états de surface obtenus. Cependant, il a été démontré que la cinétique de libération est intimement corrélée à l'état de surface des microparticules avec une libération du principe actif plus rapide pour des états de surface démontrant des trous ou des cratères [Le Ray et al., 2003; Kishida et al., 1990; Freiberg et Zhu, 2004; Yang et al., 2001]. Par conséquent, bien que le comportement morphologique des microparticules de poly(ϵ -caprolactone) soit très peu étudié, il semble être un paramètre déterminant. Il a donc été décidé d'enrichir la bibliographie en étudiant les causes d'obtentions des différents états de surface. Les cinétiques de libération résultantes ont été étudiées grâce à un principe actif modèle qui est la vitamine D₃ afin de faire suite à des travaux réalisés au sein du laboratoire utilisant ce principe actif mais une matrice polymérique différente [Almouazen et al., 2013]. Malgré cette étude complète sur les morphologies des microparticules de poly(ϵ -caprolactone), le polymère n'a pas été sélectionné pour la suite de l'étude. En effet, le taux de charge obtenu avec les microparticules d'alcool phényléthylique était très bas (inférieur à 2%) probablement dû à un manque d'affinité entre l'actif et le poly(ϵ -caprolactone) [Chung et al., 2001 ; Fernández-Carballido et al., 2004]. Cette faible teneur en alcool phényléthylique n'aurait pas permis une libération sur des temps longs. Les microparticules de polyméthacrylate de méthyle ont, quant à elles, pu être caractérisées par une morphologie lisse et sphérique avec un taux de charge de 10% en alcool phényléthylique. Elles ont donc été utilisées pour la fonctionnalisation des surfaces de polyoléfine.

La **deuxième partie** de cette étude expérimentale est focalisée sur la réalisation de conditionnements primaires actifs possédant une activité antimicrobienne afin de limiter la concentration en agents antimicrobiens introduite au sein de la formulation. La fonctionnalisation du conditionnement primaire utilisée pour ce projet est celle d'enduction de films minces antimicrobiens. En effet, cette technique est simple à mettre en place [Scriven, 1988] et permet d'éviter une éventuelle dégradation de l'agent antimicrobien causée par les températures élevées d'extrusion ou de moulage par injection haute température du

conditionnement primaire [Suppakul et al., 2003 ; Han et Floros, 1999]. De plus, le procédé de revêtement par immersion (*dip coating*) utilisée permet une industrialisation rapide étant facilement utilisable dans les zones de production sans investissement conséquent ce qui est en accord avec le cahier des charges du projet. L'utilisation de films contenant des microparticules pourrait être prometteur afin d'obtenir une libération contrôlée et prolongée dans le temps [Appendini et al., 2002 ; Guiga et al., 2009]. Cependant, ce sujet reste très peu étudié dans la littérature comparé à l'introduction directe d'agents antimicrobiens non encapsulé au sein du liant [An et al., 2000 ; Sayanjali et al., 2011; Möller et al., 2004; Lee et al., 2003]. Il représente donc une thématique innovante répondant aux critères du projet Stabipack. Le liant sélectionné pour les manipulations est un liant commercial afin de faciliter son acquisition par les industriels du projet Stabipack. Il est également biocompatible dans un souci d'innocuité par rapport à l'application topique de la formulation cosmétique. Différentes plaques de polyoléfine fonctionnalisées par des couches minces de microparticules de polyméthacrylate de méthyle chargées en alcool phényléthylique ont été effectuées et caractérisées en fonction des paramètres du procédé et de la formule du liant. Les cinétiques de libération résultantes ont été étudiées et comparées par rapport à celle obtenue pour une couche dans laquelle l'agent antimicrobien non encapsulé est dispersé au sein de la matrice de liant.

La **troisième** et dernière **partie** de cette étude expérimentale concerne l'influence des paramètres de formulation sur l'activité antimicrobienne de l'alcool phényléthylique. En effet, la réalisation d'un conditionnement primaire actif antimicrobien assurant la protection de la formulation à des endroits ciblés sensibles à la contamination doit permettre de diminuer la concentration en agent antimicrobien présente au sein de la formulation. Par conséquent, la fraction en alcool phényléthylique est réduite à la concentration minimale nécessaire pour obtenir une efficacité antimicrobienne. Or, il est bien souvent compliqué de prédire l'activité antimicrobienne d'un conservateur introduit au sein de systèmes complexes car des phénomènes de partage diminuent la fraction disponible en agent antimicrobien. Il est donc nécessaire de réaliser des challenges tests afin de déterminer le critère d'acceptation de la formulation. Cependant, de telles mesures microbiologiques prennent du temps et sont onéreuses. Il semble donc important de pouvoir réduire le nombre de tests effectués. Pour cela, des modèles mathématiques permettant de prédire la concentration en conservateur nécessaire afin d'assurer la protection d'émulsions ont été développés entre 1960 et 1970 [Bean et al., 1965; Bean et al., 1969; Garrett, 1966; Patel et Romanowski, 1970; Kazmi et Mitchell, 1971]. Cependant, les corrélations entre les résultats théoriques et les activités antimicrobiennes mesurées grâce à des tests normés ont rarement été établies. Par exemple, Kazmi et Mitchell, 1978 ont dénombré les cellules bactériennes d'*Escherichia coli* en utilisant la technique de filtration membranaire pendant 8 heures et Patel et Romanowski, 1970 ont étudié la croissance d'*Aspergillus niger* pendant 2 semaines grâce à la présence d'hyphes mycéliens visibles. Les autres travaux de ce domaine n'ont pas réalisé d'essais microbiologiques afin de corréler les données théoriques à des études d'activité antimicrobienne [Shimamoto et Mima, 1979; Watrobska-Swietlikowska et Sznitowska, 2006; Han et Washington, 2005]. L'originalité des travaux effectués lors de cette thèse par rapport à l'ensemble de la littérature réside donc dans

le fait que les données obtenues grâce au modèle mathématique établi sont comparées aux mesures de l'efficacité antimicrobienne utilisant un dénombrement des cinq souches microbiennes du challenge test pendant 14 jours. Différents essais microbiologiques ont été réalisés afin d'étudier l'impact des paramètres de formulation sur l'activité antimicrobienne de l'alcool phényléthylique et pouvoir ainsi prédire la relation dose/efficacité selon la formule. L'étude s'est focalisée sur une solution micellaire et une émulsion directe utilisant des matières premières rencontrées très fréquemment dans les produits cosmétiques.

Références

- [Almouazen et al., 2013] Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L. P., Fessi, H., & Briançon, S. (2013). Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation, *Pharm. Res.*, 30, 1137–1146.
- [An et al., 2000] An D., Kim Y., Lee S., Paik H., Lee D., 2000. Antimicrobial low density polyethylene film coated with bacteriocins in binder medium, *Food Sci. Biotechnol.*, 9, 14–20.
- [Appendini et Hotchkiss, 2002] Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 3, 113–126.
- [Bean et al., 1965] Bean H.S., Heman-Ackah S.M., Thomas J., 1965. The activity of antibacterials in two-phase systems, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 16, 15–30.
- [Bean et al., 1969] Bean H.S., Konning G.H., Malcolm S.A., 1969. A model for the influence of emulsion formulation on the activity of phenolic preservatives, *J. Pharm. Pharmacol.*, 21, 173–181.
- [Brannon-Peppas, 1995] Brannon-Peppas L., 1995. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 116, 1–9.
- [Chung et al., 2001] Chung T.W., Huang Y.Y., Liu Y.Z., 2001. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLA microspheres, *Int. J. Pharm.*, 212, 161–169.
- [Corre et al., 1990] Corre J., Lucchini J.J., Mercier G.M., Cremieux A., 1990. Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations, *Res. Microbiol.*, 141, 483–497.
- [Dordunoo et al., 1995] Dordunoo S.K., Jackson J.K., Arsenault L.A., Oktaba A.M., Hunter W.L., Burt H.M., 1995. Taxol encapsulation in poly (epsilon-caprolactone) microspheres, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 36 279–282.
- [Dubernet et al., 1987] Dubernet C., Benoit J.P., Couarraze G., Duchêne D., 1987. Microencapsulation of nitrofurantoin in poly(ε-caprolactone): tableting and in vitro release studies, *Int. J. Pharm.*, 35, 145–156.
- [Fernández-Carballido et al., 2004] Fernández-Carballido, A., Herrero-Vanrell, R., Molina-Martinez, I. T., & Pastoriza, P., 2004. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: effect of Labrafil addition on release in vitro, *Int. J. Pharm.*, 279, 33–41.
- [Freiberg et Zhu, 2004] Freiberg S., Zhu X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release, *Int. J. Pharm.*, 282, 1–18.

- [Garrett, 1966] Garrett E.R., 1966. A basic model for the evaluation and prediction of preservative action, *J. Pharm. Pharmacol.*, 18, 589–601.
- [Guiga et al., 2009] Guiga W, Galland S, Peyrol E, Degraeve P, Carnet-Pantiez A, Sebti I. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10, 203–207.
- [Han et Floros, 1999] Han J.H., Floros J.D., 1999. Modeling antimicrobial activity loss of potassium sorbate against Baker's yeast after heat process to develop antimicrobial food packaging materials, *Food Sci. Biotechnol.*, 8, 11–14.
- [Han et Washington, 2005] Han J., Washington C., 2005. Partition of antimicrobial additives in an intravenous emulsion and their effect on emulsion physical stability, *Int. J. Pharm.*, 288, 263–271.
- [Jalil et Nixon, 1990] Jalil, R., Nixon, J.R., 1990. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid) III: effect of the polymer molecular weight on the microcapsule properties, *J. Microencapsul.*, 7, 41–52.
- [Jeong et al., 2003] Jeong J.C., Lee J., Cho K., 2003. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Rel.*, 92, 249–258.
- [Kazmi et Mitchell, 1971] Kazmi S.J.A., Mitchell A.G., 1971. Dialysis method for determining preservative distribution in emulsions, *J. Pharm. Sci.*, 60, 1422–1424.
- [Kazmi et Mitchell, 1978] Kazmi S.J.A., Mitchell A.G., 1978. Preservation of solubilized and emulsified systems I: Correlation of mathematically predicted preservative availability with antimicrobial activity, *J. Pharm. Sci.*, 67, 1260–1266.
- [Kim et al., 2005] Kim B.K., Hwang S.J., Park J.B., Park H.J., 2005. Characteristics of felodipine-located poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Microencapsul.*, 22, 193–203.
- [Kishida et al., 1990] Kishida, A., Dressman, J.B., Yoshioka, S., Aso, Y., Takeda Y., 1990. Some determinants of morphology and release rate from poly(L)lactic acid microspheres, *J. Control. Rel.*, 13, 83–89.
- [Kumar, 2000] Kumar M.N.V.R., 2000. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3, 234–258.
- [Le Ray et al., 2003] Le Ray A.M., Chiffolleau S., Iooss P., Grimandi G., Gouyette A., Daculsi G., Merle C., 2003. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility, *Biomaterials*, 24, 443–449.
- [Lee et al., 2003] Lee C.H., An D.S., Park H.J., Lee D.S., 2003. Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating, *Packag. Technol. Sci.*, 16, 99–106.

- [Lilley et Brewer, 1953] Lilley B.D., Brewer J.H., The selective antibacterial action of phenylethyl alcohol, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 42, 6–8.
- [Lucchini et al., 1990] Lucchini J.J., Corre J., Cremieux A., 1990. Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols, *Res. Microbiol.*, 141, 499–510.
- [Möller et al., 2004] Möller H., Grelier S., Pardon P., Coma V., 2004. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films, *J. Agr. Food Chem.*, 52, 6585–6591.
- [Patel et Romanowski, 1970] Patel N.K., Romanowski J.M., 1970. Heterogeneous systems II: influence of partitioning and molecular interactions on in vitro biologic activity of preservatives in emulsions, *J. Pharm. Sci.*, 59, 372–376.
- [Perez et al., 2000] Perez M.H., Zinutti C., Lamprecht A., Ubrich N., Astier A., Hoffman M., Bodmeier R., Maincent P., 2000. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both lipophilic and hydrophilic drug, *J. Control. Rel.*, 65, 429–438.
- [Roy et al., 1992] Roy S., Pal M., Gupta B.J., 1992. Indomethacin-loaded microspheres: design and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation, *Pharm. Res.*, 9, 1132–1136.
- [Sato et al., 1988] Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H.G., DeLuca, P.P., 1988. Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. Part 1. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques, *Pharm. Res.*, 5, 21–30.
- [Sayanjali et al., 2011] Sayanjali S., Ghanbarzadeh B., Ghiassifar S., 2011. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios, *LWT – Food Sci. Technol.*, 44, 1133–1138.
- [Scriven, 1988] Scriven L.E., 1988. Physics and applications of dip coating and spin coating, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 121, 717–729.
- [Shimamoto et Mima, 1979] Shimamoto T., Mima H., 1979. A model for the evaluation and prediction of preservative activity in oil-in-water emulsions, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 2743–2750.
- [Suave et al., 2010] Suave J., Dall'Agnol E.C., Pezzin A.P.T., Meier M.M., Silva D.A.K., 2010. Biodegradable microspheres of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ϵ -caprolactone) loaded with Malathion pesticide: preparation, characterization, and in vitro controlled release testing, *J. Appl. Polym. Sci.*, 117 3419–3427.
- [Suppakul et al., 2003] Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger S.W., 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications, *J. Food Sci.*, 68, 408–420.

[Watrobska-Swietlikowska et Sznitowska, 2006] Watrobska-Swietlikowska D., Sznitowska M., 2006. Partitioning of parabens between phases of submicron emulsions stabilized with egg lecithin, *Int. J. Pharm.*, 312, 174–178.

[Yang et al., 2001] Yang Y.Y., Chung T.S., Ng N.P., 2001. Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials*, 22, 231–241.

[Zhu et al., 2005] Zhu K.J., Li Y., Jiang H.L., Yasuda H., Ichimaru A., Yamamoto K., Lecomte P., Jerome R., 2005. Preparation, characterization and in vitro release properties of ibuprofen-loaded microspheres based on polylactide, poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers, *J. Microencapsul.*, 22, 25–36.

Partie expérimentale

Chapitre I:

Détermination des paramètres influençant la morphologie des microsphères de poly(ϵ -caprolactone) et étude des cinétiques de libération résultantes

Introduction

Actuellement, la microencapsulation est largement utilisée dans divers domaines tels que les secteurs pharmaceutique, cosmétique ou encore agro-alimentaire afin d'assurer le contrôle de la libération du principe actif. Plusieurs techniques d'encapsulation sont disponibles et parmi elles, la microencapsulation par évaporation de solvant est communément utilisée de par une manipulation nécessitant un matériel usuel et des conditions opératoires douces [Kim et al., 2005]. Le poly(ϵ -caprolactone) est souvent retrouvé dans la bibliographie comme matrice enrobante de par ses propriétés de biocompatibilité et biodégradabilité intéressantes lorsque l'application concerne l'être vivant [Wiscke and Schwendeman, 2008]. Cependant, des états de surface éloignés du standard lisse ont été obtenus dans la littérature avec des morphologies démontrant des cicatrices et des défauts [Dubernet et al., 1987; Sato et al., 1988; Jalil et Nixon, 1990; Jeong et al., 2003], de la rugosité [Suave et al., 2010] ou encore avec des trous [Dordunoo et al., 1995; Perez et al., 2000; Dubernet et al., 1987; Zhu et al., 2005]. Les morphologies des microparticules de poly(ϵ -caprolactone) réalisées par microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple ont ainsi démontré être sensibles aux conditions opératoires. En effet, des états de surface de type lisses peuvent devenir rugueux ou encore troués en fonction des paramètres de formulation et du procédé. Bien que ces morphologies détériorées aient déjà été observées dans la littérature très peu de travaux ont étudié leur cause. Cependant, il a été démontré que l'état de surface des microparticules a un impact déterminant sur la cinétique de libération du principe actif, notamment pour des morphologies trouées qui délivrent l'actif plus rapidement que des particules lisses [Le Ray et al., 2003; Kishida et al., 1990; Freiberg and Zhu, 2004; Yang et al., 2001].

L'objectif de cette étude est de déterminer les différents facteurs et mécanismes physico-chimiques intervenant dans les dégradations morphologiques des microparticules de poly(ϵ -caprolactone) réalisées par microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple. Enfin, l'impact des différents états de surface sur la cinétique de libération d'un principe actif a été mesuré.

Afin d'étudier l'influence des paramètres de formulation sur les morphologies, plusieurs masses molaires et masses de poly(ϵ -caprolactone) ont été utilisées au sein de la phase organique. Ceci a permis de comprendre l'influence de la viscosité de la phase dispersée sur l'état de surface des microparticules. De plus, l'impact de la stabilisation de l'interface des

gouttelettes d'émulsion sur les morphologies a été considéré de par l'utilisation de deux tensioactifs largement utilisés dans la littérature à savoir l'alcool polyvinylique et le polysorbate 80 [Kim et al., 2005; Li et al., 2008]. Concernant l'influence des paramètres du procédé, une hélice marine ainsi qu'une tripâle droite ont été utilisées à différentes vitesses afin de modifier la force d'agitation et de cisaillement appliquées au sein du système.

L'état de surface des microsphères a été observé par microscopie électronique à balayage. Des coupes ont également été réalisées grâce à un microtome à froid ainsi que par fracture dans de l'azote liquide afin de visualiser les morphologies internes.

Le suivi *in situ* du procédé d'encapsulation à l'aide d'une sonde vidéo immergée dans le réacteur agité a été utilisé afin de déterminer les mécanismes physico-chimiques intervenant dans les dégradations morphologiques. Les deux principaux avantages quant à l'utilisation du suivi *in situ* sont le suivi en temps réel du procédé, et l'observation possible au sein même du milieu agité. Ceci permet d'éviter les inconvénients provenant de l'échantillonnage et les manipulations qui sont nécessaires pour les observations microscopiques *ex situ*. Cette visualisation *in situ* a été complétée par différentes mesures tant de la tension interfaciale que du coefficient de partage eau/dichlorométhane des tensioactifs permettant d'identifier les phénomènes impliqués. Enfin, la cinétique d'évaporation a également été mesurée dans le but d'établir une relation entre les déformations morphologiques des particules et la vitesse de solidification des gouttelettes d'émulsion.

Pour compléter et terminer ce travail de recherche, l'influence des différents états de surface sur la cinétique de libération *in vitro* a été mesurée pour un principe actif modèle qui est la vitamine D₃. Afin de mener une étude qui puisse être comparative, les microparticules sélectionnées pour cette dernière investigation ont été caractérisées par un diamètre et une teneur en principe actif équivalents.

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale au sein du congrès international *Bioencapsulation* tenu à Bratislava, en Slovaquie, du 17 au 19 septembre 2014. Il est proposé dans ce manuscrit sous la forme d'une publication acceptée dans le journal scientifique *International Journal of Pharmaceutics*.

Références

- [Dordunoo et al., 1995] Dordunoo S.K., Jackson J.K., Arsenault L.A., Oktaba A.M., Hunter W.L., Burt H.M., 1995. Taxol encapsulation in poly (ϵ -caprolactone) microspheres, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 36 279–282.
- [Dubernet et al., 1987] Dubernet C., Benoit J.P., Couarraze G., Duchene D., 1987. Microencapsulation of nitrofurantoin in poly (ϵ -caprolactone): tableting and in vitro release studies, *Int. J. Pharm.*, 35, 145–156.
- [Freiberg et Zhu, 2004] Freiberg S., Zhu X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release, *Int. J. Pharm.*, 282, 1–18.
- [Jalil et Nixon, 1990] Jalil, R., Nixon, J.R., 1990. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid) III: effect of the polymer molecular weight on the microcapsule properties, *J. Microencapsul.*, 7, 41–52.
- [Jeong et al., 2003] Jeong J.C., Lee J., Cho K., 2003. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Rel.*, 92, 249–258.
- [Kim et al., 2005] Kim B.K., Hwang S.J., Park J.B., Park H.J., 2005. Characteristics of felodipine-located poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Microencapsul.*, 22, 193–203.
- [Kishida et al., 1990] Kishida, A., Dressman, J.B., Yoshioka, S., Aso, Y., Takeda Y., 1990. Some determinants of morphology and release rate from poly(L)lactic acid microspheres, *J. Control. Rel.*, 13, 83–89.
- [Le Ray et al., 2003] Le Ray A.M., Chiffolleau S., Iooss P., Grimandi G., Gouyette A., Daculsi G., Merle C., 2003. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility, *Biomaterials*, 24, 443–449.
- [Li et al., 2008] Li M., Rouaud O., Poncelet D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches, *Int. J. Pharm.*, 363, 26–39.
- [Perez et al., 2000] Perez M.H., Zinutti C., Lamprecht A., Ubrich N., Astier A., Hoffman M., Bodmeier R., Maincent P., 2000. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both lipophilic and hydrophilic drug, *J. Control. Rel.*, 65, 429–438.

[Sato et al., 1988] Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H.G., DeLuca, P.P., 1988. Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. Part 1. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques, *Pharm. Res.*, 5, 21–30.

[Suave et al., 2010] Suave J., Dall'Agnol E.C., Pezzin A.P.T., Meier M.M., Silva D.A.K., 2010. Biodegradable microspheres of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ϵ -caprolactone) loaded with Malathion pesticide: preparation, characterization, and in vitro controlled release testing, *J. Appl. Polym. Sci.*, 117 3419–3427.

[Wiske et Schwendeman, 2008] Wiske C., Schwendeman S.P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *Int. J. Pharm.*, 364, 298–327.

[Yang et al., 2001] Yang Y.Y., Chung T.S., Ng N.P., 2001. Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials*, 22, 231–241.

[Zhu et al., 2005] Zhu K.J., Li Y., Jiang H.L., Yasuda H., Ichimaru A., Yamamoto K., Lecomte P., Jerome R., 2005. Preparation, characterization and in vitro release properties of ibuprofen-loaded microspheres based on polylactide, poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers, *J. Microencapsul.*, 22, 25–36.

The parameters influencing the morphology of poly(ϵ -caprolactone) microspheres and the resulting release of encapsulated drugs

Jessica Bile^a, Marie-Alexandrine Bolzinger^a, Charlène Vigne^a, Olivier Boyron^b, Jean-Pierre Valour^a, Hatem Fessi^a, Yves Chevalier^{a*}

^a Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), CNRS UMR 5007, 43 bd du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France.

^b Université Claude Bernard Lyon 1, *Laboratoire de Chimie et Procédés* de Polymérisation (C2P2), CNRS UMR 5265, CPE, 43 bd du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France.

Abstract

Polymer microparticles used for drug encapsulation and delivery have various surface morphologies depending on the type of formulation ingredients and parameters of the manufacture process. This work aims at investigating the critical parameters governing the morphology of microparticles and to underline the influence of their surface state on the drug release. The classical fabrication process by the "emulsion - solvent evaporation" is addressed using poly(ϵ -caprolactone) as the polymer and methylene chloride as the volatile organic solvent. The typical surfactants poly(vinyl alcohol) and polysorbate 80 have been considered. Scanning electron microscopy observations showed the various surface morphologies mainly depending on the stirring rate, the viscosity of the oil phase and by the presence of inappropriate surfactants. Because of arrested coalescence during solvent evaporation, the evaporation of the organic solvent causing particles hardening is the most important parameter that controls the morphology. Indeed, slow evaporation allows partial coalescence of the soft particles swollen by the organic solvent, whereas the particles morphology is frozen rapidly upon fast evaporation, thus preventing damaged surface states. Moreover, an effective stabilizing system for the primary emulsion is also a determining factor to control the final morphology. The morphology of the particles has a definite influence on the drug delivery of cholecalciferol. The surface morphology should be taken into consideration in the design of polymer microparticles because it allows a control over the drug release kinetics.

Key words: microencapsulation, morphology, drug release, poly(ϵ -caprolactone), cholecalciferol, *in situ* video probe.

* Correspondance to: chevalier@lagep.univ-lyon1.fr (Yves Chevalier); Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Université Lyon 1, 43 bd du 11 Novembre, F-69622 Villeurbanne, France.

1. Introduction

Microencapsulation has been used for a long time in the pharmaceutical field because of its obvious advantages such as the drug protection and controlled delivery. The resulting targeting and prolonged treatment reduces the systemic concentration of drugs and allows decreasing the administration frequency, leading to decreased side effects and improved patient convenience (Dhanarajua et al., 2010). To reach such achievements, microencapsulation using the oil/water (o/w) emulsion / solvent evaporation technique is common owing to its easy implementation (Kim et al., 2005). It has enabled the encapsulation of numerous lipophilic active agents such as nifedipine or progesterone (Sansdrap and Moës, 1993; Benoit et al., 1986). Encapsulation has improved the activity of vitamin D₃ (cholecalciferol) that is very sensitive to degradation and needs a protection against the environment (Petriz et al., 2006, Gonnet et al., 2010, Almouazen et al., 2013). The polymer materials used for pharmaceutical applications are most often aliphatic polyesters such as the poly(lactic acid) (PLA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) because of their biocompatibility and biodegradability (Wiske and Schwendeman, 2008).

Typical formulation and processing parameters of the conventional microencapsulation process by o/w emulsion / solvent evaporation are the polymer molar mass and concentration, the drug/polymer ratio, the surfactant type, and the speed and shear rate of the agitation system (Li et al., 2008; Benoit et al., 1999; Zu et al., 2005; Sansdrap and Moës, 1993; Jeyanthi et al., 1997). The impact of these factors on microspheres size, drug loading and drug release is well-documented (O'Donnell and McGinity, 1997). Nevertheless, researches concerning the microparticles surface state are scarce and the influence of each parameter is not well understood. It has been reported that deteriorated morphologies were obtained in case of evaporation under reduced pressure due to the amorphous state of the polymer matrix (Izumikawa et al., 1991; Chung et al., 2001). Dubernet et al. (1987) also noticed that the surface state was related to the microspheres size.

Among the aliphatic polyesters available, the polycaprolactone has been under most of the investigations because its degradation is slow and does not generate an acidic environment (Dash et al., 2012; Woodruff and Hutmacher, 2010). Slow degradation enables long term sustained drug release (Sinha et al., 2004). However, PCL microspheres resulting from the o/w emulsion/solvent evaporation process exhibited some rough (Suave et al., 2010), or pitted morphologies (Dordunoo et al., 1995), with surfaces containing big holes (Zhu et al., 2005) and deep cracks (Dubernet et al., 1987). Deteriorated morphologies have just been noticed in most instances and, to the best of our knowledge, their formation has rarely been investigated in details. Indeed, most publications focused on drug release better than morphology. Nevertheless, the drug release is strongly correlated to the surface state. Indeed, damaged morphologies showing pores and craters were correlated with faster drug release (Le Ray et al., 2003; Kishida et al., 1990; Freiberg and Zhu, 2004; Yang et al., 2001). As a consequence, even

if the morphological behavior of PCL microparticles is poorly addressed in the literature, it has been found to be an important parameter.

To design biodegradable polymeric microspheres with the desired drug release profile it seems worth identifying the factors that impact the morphology for the commonly used poly(ϵ -caprolactone) microparticles prepared by the emulsion / solvent evaporation technique. The present contribution purposes to discuss the causes of morphological damages with respect to the formulation and process parameters such as the dispersed phase viscosity, the agitation system, and the type of surfactants in the emulsification process. Typical surfactants like poly(vinyl alcohol) (PVA) and polysorbate 80 and the most commonly used solvent dichloromethane (DCM) were used in order to match to the general framework of most previous studies (Kim et al., 2005; Li et al., 2008). Blank microparticles were studied in a first step in order to understand the morphological phenomenon without active agent. Then, loaded microparticles with cholecalciferol were formulated without modification of the expected surface state in order to study the relationships between the surface state and the drug release. Cholecalciferol has an antitumoral activity in supraphysiological conditions (Gross et al., 1998) and its targeted sustained delivery enables the administration of effective serum concentration without risk of hypercalcemia. Cholecalciferol has been selected in the present study because there are obvious advantages of its encapsulation in a sustained drug delivery system. Encapsulation is an interesting solution for administration of cholecalciferol and several studies have previously been reported on this subject proving that encapsulation enhances the drug activity (Almouazen et al., 2013, Gonnet et al., 2010, Petriz et al., 2006). It is also an appropriate candidate for further studies of the effect on the skin for the keratinocyte differentiation.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The two poly(ϵ -caprolactone) (PCL) polymers of number-average molar masses M_n 45,000 Da and 80,000 Da were denoted as PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀ in the following. PCL₄₅₀₀₀, PCL₈₀₀₀₀, poly(vinyl alcohol) (PVA) of hydrolysis rate 86.7-88.7% and weight-average molar mass M_w 31,000 Da, and dichloromethane (DCM) of reagent grade were purchased from Sigma-Aldrich. Polysorbate 80 was from Fisher Scientific. Cholecalciferol (vitamin D3) of 99% purity was from Alfa Aesar. All other reagents were reagent grade and used as supplied.

2.2. Preparation of microspheres

In a first step, an o/w emulsion was prepared with a mass ratio between the organic and aqueous phases of 1/10. The aqueous phase (300 g) contained 1 wt% of PVA as stabilizer (and 1 wt% of polysorbate 80 in some experiments). For blank microparticles, the organic phase was a solution of either PCL₈₀₀₀₀ or PCL₄₅₀₀₀ dissolved in 30 g of DCM at various polymer/solvent mass ratios: 3.3 wt%, 10 wt% and 20 wt%. For loaded microparticles, cholecalciferol was added

in the organic phase in order to obtain a loading capacity $DL = 2$ wt%. The drug loading capacity and encapsulation efficiency of cholecalciferol were calculated as follows (Gupta and Kumar, 2001; Huang et al., 2010):

$$\text{Drug loading capacity: } DL = \frac{\text{mass of cholecalciferol in the PCL particles}}{\text{mass of PCL}} \quad (1)$$

$$\text{Encapsulation efficiency: } EE = \frac{\text{mass of cholecalciferol in the PCL particles}}{\text{total mass of added cholecalciferol}} \quad (2)$$

The emulsion was prepared by pouring the organic phase in the aqueous phase under stirring. Different stirrers were used: a three flat blades propeller of 40 mm diameter at the rotation rate of 860 rpm or a marine propeller of 38 mm diameter at the rotation rate of 500 rpm. The emulsions were left 4 h under the same stirring conditions at room temperature and atmospheric pressure to allow for the DCM evaporation. The resulting solid microspheres were filtered and air-dried overnight at room temperature. The abbreviations of the batches are given in Fig 1.

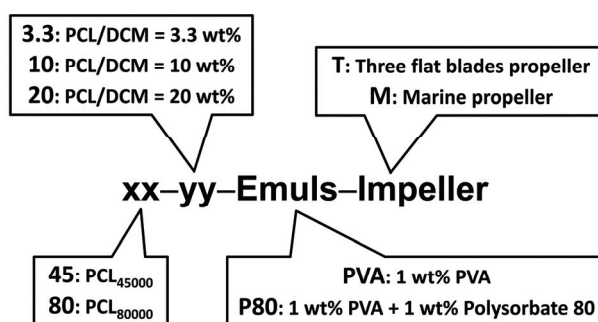


Figure 1. Abbreviation codes for the batch names.

2.3. Particle size analysis

The size distributions of emulsion droplets and microspheres were characterized by laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern, UK). For the size measurement of the emulsion droplets, the dilution medium was composed of a surfactant solution (PVA 1 wt% or PVA 1 wt% + polysorbate 80 1 wt% depending on the experiment) in water saturated with DCM. For the size measurements of the microspheres, the dilution medium was pure water. The particle size distribution was calculated from the scattered intensity using the Fraunhofer theory which is valid for the large particle size of the present study. The average of triplicate measurements for each batch was made. Particle sizes were expressed as the average diameter (Sauter diameter, $d_{3,2}$).

2.4. In situ monitoring the emulsions with the video probe

In situ monitoring of the microencapsulation process according to the formulations described in the Table 1 was performed using the video probe EZ PROBE D25 L12001 designed in our

laboratory. Such video probe records pictures of emulsion droplets, polymer particles, crystalline particles inside the stirred vessel (Gagnière et al., 2009; Khalil et al., 2010; Khalil et al., 2012; Ach et al., 2015). Such instrument allows imaging the particles *in situ* during the course of the process. As an obvious benefit, it allows observations of unstable particles inside the stirred vessel, without having to stop the agitation or to sample out an aliquot. The probe was immersed in the vessel and enabled the recording of real time 2D images of the dispersion at the rate of 50 frames per second. It was equipped with back-lighting making the droplets black on a white background.

2.5. Scanning electron microscopy

The shape and surface state of microparticles as well as the internal morphology were studied using scanning electron microscopy (SEM) (Neoscope, JCM-5000, JEOL, Japan). 10 mg of dried microparticles were suspended in 5 mL of ultra-pure water. A drop of this suspension was deposited on a double-sided adhesive carbon paste tape stuck onto an aluminum stub. After drying, it was vacuum coated with a 20 nm thickness platinum film under an argon atmosphere. Samples were directly observed with SEM in high vacuum mode using an acceleration voltage of 10 kV. The internal morphology of microparticles was observed after freeze-fracture with a microtome either in liquid nitrogen, or at -80°C , or at -40°C .

2.6. Evaporation rate of dichloromethane

The evaporation rate of DCM was measured by weighing the microparticle suspensions under stirring every 3 min. The mass loss was determined by comparing the mass measured at a given time to the initial mass. The same experiment using only aqueous phase with the same agitation system was used as control. It has been proved that the solvent evaporation profile was linear at short durations, so that the evaporation rate was constant and could be described by the following equation based on Fick's law (Eq 1; Li et al., 2008):

$$\frac{dM}{dt} = -AKC_s \quad (3)$$

where M is the solvent total mass in the reactor (kg), t is the time (s), A is the surface area (m^2) of the air-water interface, K is the evaporation rate constant (m.s^{-1}), and C_s is the solvent concentration in the continuous phase (kg.m^{-3}). The evaporation rate has been determined from the slope of the mass loss with respect to time during the first 15 min of the evaporation process.

2.7. Viscosity measurements of the oil phase

The viscosity of the different organic phases was determined without cholecalciferol using a rotational rheometer (Modular Compact Rheometer 302 Anton Paar, Austria). Steady-shear viscosity measurements were performed at 20°C with a cone-and-plate geometry (0.997° ,

diameter 50 mm. Shear stress measurements were carried out in experiments where the shear rate ($\dot{\gamma}$) was increased stepwise from 0.1 to 300 s⁻¹ in 60 s.

2.8. Measurement of interfacial tension by the pendant drop method

The interfacial tension between the aqueous and organic phases of the emulsion was measured by the pendant drop method (Drop Shape Analysis DSA10M122, Krüss, Germany) at ambient temperature. Pendant drops were suspended at the tip of a 0.5 cm diameter stainless steel needle in a glass cell filled with 5 mL of pure water or water containing various surfactants. The interfacial tension was determined from the drop profile using the Laplace equation (Girault et al., 1984). The aqueous phase contained the surfactant and the organic phase was a 3.3 wt% solution of PCL₈₀₀₀₀ in DCM.

2.9. Surfactant partition coefficient

The partition coefficient of the surfactant between the aqueous and oil phases was measured in triplicate by introducing 1 wt% of polysorbate 80 or PVA in 6 mL of water and 6 mL of DCM previously saturated with each other. The mixture was stirred magnetically for 5 h at ambient temperature and the phases were separated by centrifugation (Centrifuge 5430, Eppendorf, Germany) for 20 min at 7,000 rpm which corresponded to relative centrifugal force of 5752 *g* in order to break the emulsion. Each phase was collected and analyzed for the surfactant concentration by thermogravimetry.

2.10. Determination of drug loading

100 mg of microparticles were introduced in 10 mL acetonitrile. The mixture was left for 3 hours under stirring and then filtered through a 0.45 µm syringe filter. The samples were analyzed for cholecalciferol content using high-pressure liquid chromatography with a reverse phase column. The HPLC set up from Agilent (France) was composed of a Agilent 717 injector, an Agilent pump, a reverse phase column X-Terra MS C18 column (5 µm, 4.6 × 250 mm) and a photodiode array UV detector working at 265 nm wavelength. The elution with methanol/acetonitrile/acetic acid 0.5% (85:10:5) solvent at 1.3 mL.min⁻¹ flow rate and 30°C gave a retention time of 5.12 min for cholecalciferol. The calibration curve for quantitative analysis was linear up from 0.1 to 5 µg.mL⁻¹ ($r^2 = 0.999$) (Almouazen et al., 2013). The drug loading was defined as the ratio of the drug mass to the mass of dry microparticles.

2.11 Drug release experiments

In vitro release of cholecalciferol was measured by introducing 50 mg of drug loaded microparticles in 50 mL phosphate buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4) containing 0.1 wt% sodium dodecyl sulfate (SDS) to increase the cholecalciferol solubility and ensure sink conditions (the maximum final concentration of drug was 20 µg.mL⁻¹). The medium was stirred at a moderate rate of 150 rpm at 37°C for 10 days. For everyday analysis of release of cholecalciferol, agitation was stopped and the sedimentation of microparticles was performed

by centrifugation (2000 *g*, 10 min). 4 mL of supernatant was collected, filtered through a 0.45 μ m membrane filter and analyzed by RP-HPLC using the previously mentioned HPLC method. The volume removed was replaced by fresh phosphate buffer for resuming the release experiment (Almouazen et al., 2013).

3. Results

Morphologies of blank PCL microparticles obtained from o/w microencapsulation by solvent evaporation were observed by SEM and sorted in different classes. The aim was to determine the parameters of relevance to the control of the various surface morphologies. For this purpose, the mechanism of formation of the various surface morphologies was investigated and the influence of the several parameters of relevance such as the speed and shear rate of the agitation system, the polymer molar mass, the polymer concentration in the organic phase, and the use of surfactants were investigated. All of them influenced the solvent evaporation rate that enabled the liquid emulsion droplets to convert into solid microspheres. After studying the influence of each parameter on the morphology, the release of the cholecalciferol was studied for microparticles having different morphologies in order to estimate the impact of the surface state on drug release.

3.1. Microsphere morphologies

Five different morphologies (Fig 2) that have already been observed in previous works were observed: smooth surface, dumbbells, scars and defects (Jeong et al., 2003; Dubernet et al., 1987), roughness (Suave et al., 2010), and surface states with holes (Dordunoo et al., 1995; Perez et al., 2000; Dubernet et al., 1987; Zhu et al., 2005).

The surface morphologies have been sorted into five different classes as smooth, rough, scarred, dumbbell-shaped, and holy. This is descriptive only. Since it was aimed to sort them according to their formation process and to discuss the influences of the formulation and process parameters, the different morphologies have been associated to a hypothetic formation mechanism. Various formation mechanisms have been postulated for each type of morphology, and complementary experiments have been performed as a validation of the hypotheses. The presumed scenarii are the following:

- The smooth surface is the most often expected morphology since it corresponds to the idealistic idea of the mechanism taking place by emulsification into spherical droplets containing the solution of PCL in DCM, followed by an isotropic exit of DCM causing an isotropic shrinkage of the droplets during the solvent evaporation stage. However coalescence of liquid droplets retains the smooth spherical shape and may result in the same smooth final morphology.
- The formation of dumbbells obviously came from the merging of two droplets that has been arrested before the spherical shape could be recovered because of fast particle hardening.

The origin of dumbbell formation was therefore coagulation of emulsion droplets followed by partial coalescence. Coalescence has been stopped because DCM evaporation was faster than coalescence.

- The morphology of scarred particles is close to that of dumbbells. Coalescence just went further but it did not reach completion. More than two droplets have possibly stuck together. Complete coalescence would give rise to the smooth morphology.

- The rough morphology corresponded to the attachment of many small droplets to a larger one followed by their arrested coalescence. This again requires that coagulation (flocculation) occurred and coalescence have been stopped by fast hardening due to fast DCM evaporation.

- The holey morphology was clearly different. Pinholes and large cracks were observed. It was thought that a rigid crust of PCL formed at the surface of the droplets. DCM remaining in the core of the droplets caused the crust to rupture for further removal of DCM as the evaporation proceeded.

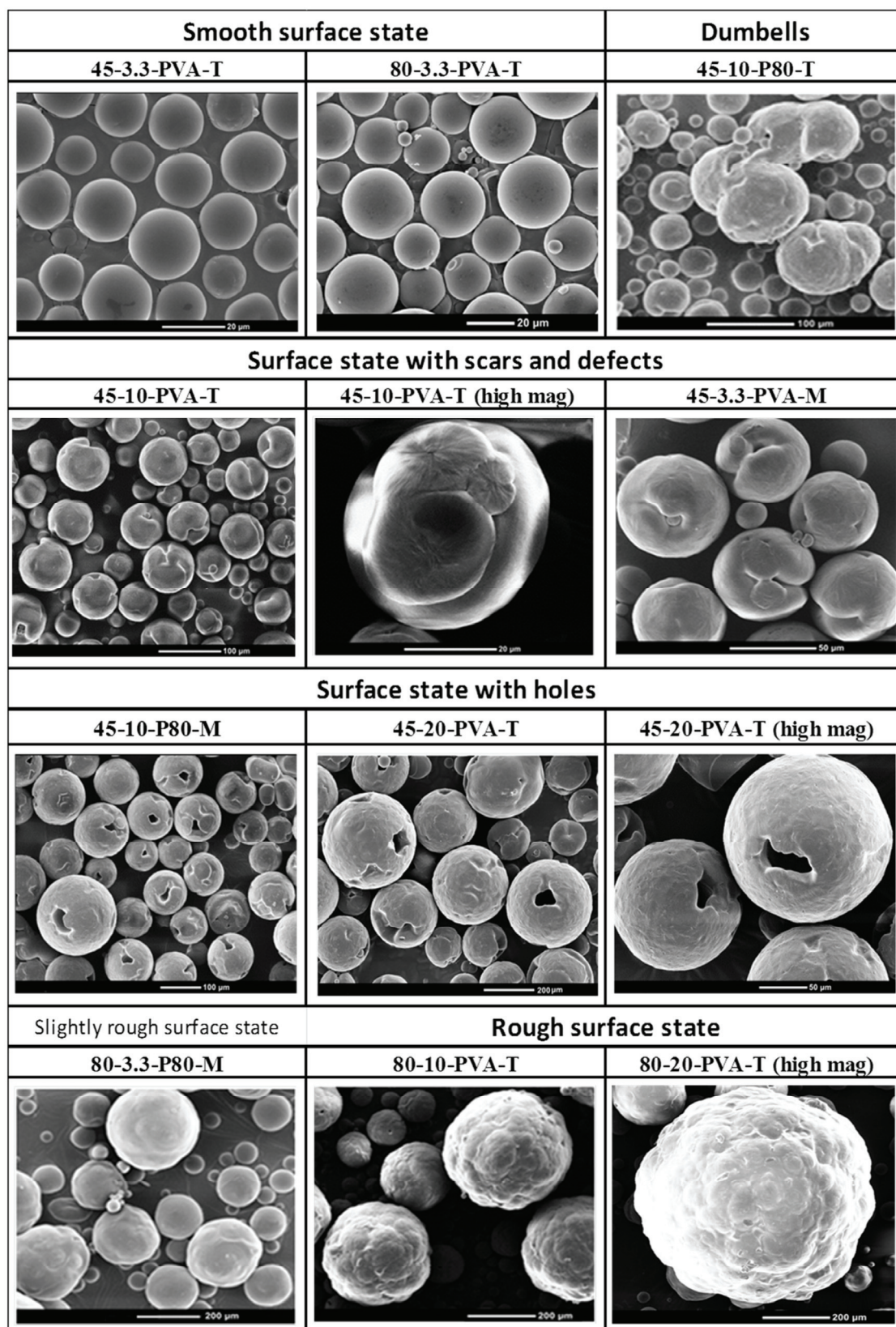


Figure 2. SEM pictures of PCL microparticles illustrating the different morphologies obtained in various experiments.

As a whole, there were only two postulated mechanisms of formation of defects at the surface of microparticles: *i*) coagulation and arrested coalescence that caused dumbbells, scars and surface roughness; *ii*) fast drying of the surface of the droplets causing the formation of a PCL crust encapsulating residual DCM and subsequent rupture of this impermeable PCL film. According to the later mechanism of holes formation, the dry microparticles should have a large cavity in their center behind the hole by which the encapsulated DCM could leak. This was indeed the case since observations of the internal structure of holy microparticles by SEM of either microtome-cut or freeze-fractured microparticles revealed the presence of voids inside the microparticles (Fig 3). Microparticles 45-10-PVA-T which had scars and showed very few pinholes at their surface had small voids in their center. Some such voids were adjoining the surface holes and others formed a closed porosity. The observed closed pores indicated that the cracks by which DCM could leak off the droplets have healed before completion of the microparticles hardening. Microparticles 45-20-PVA-T having a large density of holes at their surface were highly porous; large voids were indeed observed by SEM after freeze-fracture.

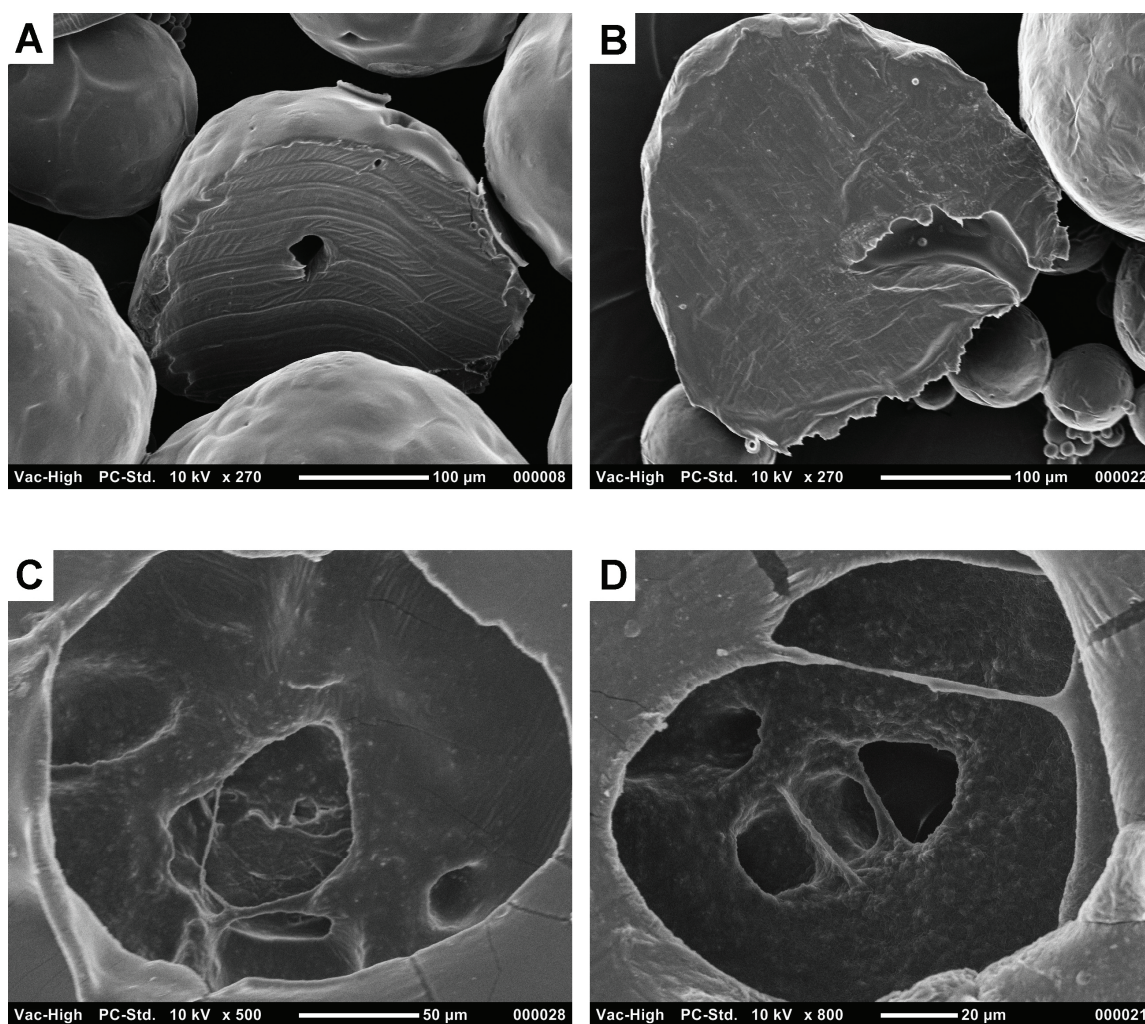


Figure 3. SEM pictures of the internal structure of fractured holy PCL microparticles showing the presence of large cavities behind the surface holes. A and B: Microparticles of 45-10-PVA-

T cut with a microtome at -45°C showing the presence of voids in the center of the particles; picture B shows a void adjoining a hole at the surface of the microparticles. C and D: Freeze-fractured microparticles of 45-20-PVA-T showing the large voids in case of extensive formation of holes and cracks at the surface of microparticles.

3.2. Assessment of the main mechanisms causing non-spherical particle shapes

The emulsion / solvent evaporation process consists in two stages: emulsification followed by solvent evaporation. Once the emulsion has been prepared, solvent evaporation of the DCM content of each droplet should cause shrinkage of each droplet such that its volume (and diameter) was reduced according to the PCL/DCM ratio. In the “ideal case” where each emulsion droplet shrunk independently so as to yield a dry polymer microparticle at the end of the solvent evaporation stage, the microparticle sizes d_{part} could be calculated from the emulsion droplet size d_{32} and polymer concentration in the oil phase from simple geometrical considerations as

$$d_{\text{part}} = d_{32} (\phi_{\text{PCL}})^{1/3} \quad (4)$$

where ϕ_{PCL} was the volume fraction of PCL in the oil phase. The experimental data reported in Table 1 did not follow such an ideal behavior. The experimental diameters of dry microparticles were much larger than those predicted from the emulsion droplet size and Eq 4 (Table 1). Obviously, coalescence took place during the solvent evaporation stage. Droplets coalescence during solvent evaporation has been inferred from the observations of scarred and rough surface morphologies of the microparticles. It was confirmed from the comparison of the droplet and microparticles sizes. Even microparticles having a smooth spherical surface had a size larger than predicted assuming individual drying of oil droplets, showing that coalescence did occur in every instance.

Table 1

Effect of the PCL concentration and molar mass on the mean diameters of the emulsion droplets and dry microparticles.

Sample	Emulsion droplet mean diameter (μm)	Mean diameter of dry microparticles (μm)	
		Calc. from Eq 2	Measured
Three flat blades propeller			
45-3.3-PVA-T	22	7	20
45-10-PVA-T	39	18	41
80-3.3-PVA-T	50	16	45
80-10-PVA-T	416	193	350
Marine propeller			
45-3.3-PVA-M	61	20	56
45-10-PVA-M	80	37	105
80-3.3-PVA-M	92	30	132
80-10-PVA-M	580	270	530

The arrested coalescence phenomenon could be observed in the stirred tank during the solvent evaporation stage by using the *in situ* video probe. Thus, Fig 4 shows instances of such oil droplets undergoing coalescence in the stirred tank, leading to non-spherical final morphologies of the microparticles, dumbbell, scars or rough surfaces. It has been inferred in several previous reports that non-spherical morphologies of the microparticles came from oil droplets or microparticles sticking together because of the tackiness of their surface (Jalil et al., 1990). The direct observations by the video probe and the final morphologies did not match to this idea. There was clear evidence of a coalescence of the oil droplets during the drying stage. The difference between “coagulation”, “sticking”, and “coalescence” is not only a semantic matter. “Coagulation” or “flocculation” is a phenomenon where oil droplets coming into contact each other because of attractive forces operating between oil droplets. As a result of coagulation, oil droplets are aggregated but they are still intact since there is still the surfactant stabilizing layer remaining at the surface of each droplet, even in the between the surface of contact between droplets. Coagulation can be reversible in case where stirring causes shear forces stronger than the attractive force between droplets. “Sticking” involves a direct contact between the tacky materials of each particle, so that the surfactant layer that remained after the coagulation should have been shifted off. “Coalescence” is a mixing process of the oil contents of contacting droplets. Two spherical liquid droplets merge into a single spherical droplet when coalescence goes to completion. In case where the oil phase is highly viscous, coalescence can be stopped before single droplets could reach the final spherical shape. This process called “arrested coalescence” causes the formation of the present non-spherical particle shapes. Oil

droplets mix during coalescence because oil is liquid. Sticking does not involve mixing of the droplets; the materials at the particles surfaces just mix on a molecular scale.

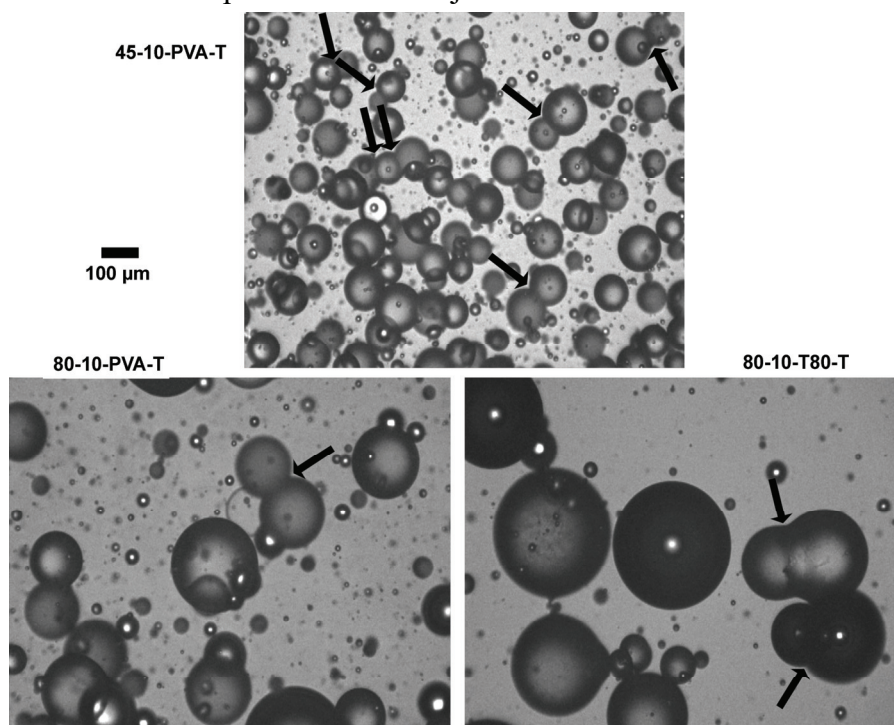


Figure 4. Pictures of coalescence phenomena observed *in situ* with the video probe. The arrows show the droplets under coalescence events.

So as to investigate the influence of the process parameters, the following physicochemical experiments were carried out. Since the competition between coalescence and solvent evaporation during the solvent evaporation stage controlled the morphology of the arrested coalescence states, the DCM evaporation rate was first measured. The rate at which solid polymer microparticles formed from emulsion droplets depended on the DCM evaporation rate and the rate at which DCM diffused out of emulsion droplets. The later process depended on the droplet size controlled by the stirring process and the viscosity of the oil phase. The emulsion prepared in the first stage of the emulsion / solvent evaporation process was characterized for the droplet size, the parameters that control such size (the stirring process and the viscosity of the oil phase), and the stability of the emulsion with regards to coagulation and coalescence. The parameters that controlled the morphology of the microparticles were several and contributed in several ways. In particular, the viscosity of the oil phase set by the molar mass of PCL and the concentration in DCM influenced the droplets size during the emulsification stage and the diffusion of DCM out of the droplets during the evaporation stage. The final size of the dry microparticles depended on both the droplet size of the emulsion and the PCL concentration in the oil phase, so that the contributions of the parameters were quite intricate. Finally the influence of type of emulsifier was addressed because unexpected results were observed in the presence of polysorbate 80.

3.3. Study of the evaporation rate of DCM

DCM evaporation occurs in four successive steps including two transfers through an interface: the oil - water and the water - gas interfaces. The two interfacial transfer rates depend on the stirring conditions. Indeed stirring leaves a stagnant layer close to the surface at which DCM transfer takes place. The transfer of DCM from the emulsion droplets to the aqueous phase and from the aqueous phase to the gas phase takes place through the stagnant layer by passive diffusion driven by the gradient of chemical potential between the two phases. The transfer rate depends on the thickness of the stagnant layer that is controlled by the stirring efficiency. First, DCM diffuses from the core of the droplets to their surface; such a passive diffusion step does not depend on the agitation. Diffusion of DCM inside the droplets depends on their size and the viscosity of the oil phase. Next, DCM is transferred from the emulsion droplets surface into the aqueous phase by diffusion through the stagnant layer. Thirdly DCM present in the bulk of the aqueous phase should reach its top surface where evaporation takes place. Such a transport of DCM in the aqueous phase is ensured by stirring. Finally, DCM crosses through the stagnant layer at the top surface of the emulsion for evaporation can take place. Such fourth step is again controlled by the stirring conditions that set the thickness of the stagnant layer. The overall rate of DCM evaporation is the slowest rate of the successive steps.

The mass loss measured during evaporation of DCM was linear with respect to time during most of the evaporation duration, so that the evaporation rate was constant. The main parameter that influenced the evaporation rate was the stirring process. Indeed the evaporation rates for a given stirring process fall in the same range within experimental accuracy. Thus, the evaporation rate was faster for the more powerful three flat blades propeller than the marine propeller by a factor of ~ 2 (Table 2). The evaporation rate was controlled by the steps that depended on stirring: the transfer of DCM through the oil - water interface, the transport of DCM in the bulk aqueous phase and the transfer of DCM through the water - air interface.

Table 2

Influence of the experiment formulation and processing parameters on the solvent evaporation rate.

Experiment	DCM evaporation rate (g.min ⁻¹)
45-3.3-PVA-T	0.91
45-3.3-PVA-M	0.27
45-3.3-P80-M	0.43
45-10-PVA-T	0.71
80-3.3-PVA-T	0.80
80-3.3-PVA-M	0.20
80-3.3-P80-M	0.35
80-10-PVA-T	0.41

The transport of DCM in the aqueous phase is given by the “mixing time” of the stirring process. This is defined as the time required for a complete renewal of the liquid in the stirred vessel. This corresponds to the time required for every elementary volume of the fluid passed once at the top surface where evaporation takes place. The “pumping flow rate” of the impeller Q_p ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) is the liquid flow rate through the impeller that depends on the type, diameter, and rotation speed of the impeller. The full circulation rate Q_c ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) containing the flow through the impeller and the back-flow is $Q_p(T/D)^{1/2}$ (Brodkey and Hershey, 1988), so that the mixing time reads

$$t = \frac{V}{Q_c} = \frac{V}{Q_p(T/D)^{1/2}} = \frac{V}{N_q N D^3 (T/D)^{1/2}} \quad (5)$$

where V is the volume of the emulsion (m^3), with N_q the “pumping number” of the impeller, D (m) the diameter of the impeller, T (m) the diameter of the tank, and N the rotation speed ($\text{rotations} \cdot \text{s}^{-1}$). Taking $N_q = 0.38$ for the three blades propeller and $N_q = 0.50$ for the marine propeller (Roustan, 1991), the mixing times were 1.1 s for the three flat blades propeller and 1.7 s for the marine propeller. Such times were very short as compared to the duration of the evaporation that lasted 20 to 40 min, showing that the circulation of DCM in the aqueous phase was not the rate-limiting step. The transfer rates through the oil - water and water - gas interfaces took place through stagnant layers that were of the same thicknesses since the stirring was the same at both interfaces. The main difference between the two interfaces was their area. The contact area between the emulsion and the gas phase was the section of the tank, that is, few cm^2 . On the contrary the oil - water interfacial area was huge; its order of magnitude was several thousand m^2 , depending on the droplet size. The transfer rate through the oil - water interface was much faster than through the water - gas interface. The transfer through the later interface was the rate-limiting step because of its restricted area.

One exception to the general behavior was 80-10-PVA-T that assumed a slower evaporation rate than other samples under stirring with the three flat blades propeller ($0.41 \text{ g} \cdot \text{s}^{-1}$ against $0.7\text{-}0.9 \text{ g} \cdot \text{s}^{-1}$ for other samples). The oil phase of 80-10-PVA-T was the most concentrated solution (10 wt%) of the highest molar mass PCL. The diffusion of DCM in the very viscous oil phase made the evaporation slower than for other sample where the oil phase was quite fluid. This showed that the composition of the oil phase may contribute to the evaporation rate. Indeed, the diffusivity of DCM is $1.26 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Lake and Rowe, 2004) against $10^{-10}\text{-}10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ in a DCM-swollen polymer material (PLGA) (Foss et al., 2009).

3.4. Characterization of the emulsion parameters

Emulsification depended on the stirring process and the physicochemical properties of the materials. The Reynolds number Re and Weber number We of the flow were calculated from the characteristics of the impellers and the physicochemical properties of the continuous phase according to equations (6) and (7).

$$Re = \frac{\rho_c N D^2}{\eta_c} \quad (6)$$

$$We = \frac{\rho_c N^2 D^3}{\gamma} \quad (7)$$

where N and D are the rotation rate (s^{-1}) and diameter (m) of the impeller, ρ_c and η_c are respectively the density ($kg.m^{-3}$) and viscosity (Pa.s) of the continuous phase, γ is the interfacial tension ($N.m^{-1}$). The viscosity of continuous phase (η_c) was taken as the viscosity of a 1% PVA solution, 1.2 mPa.s. The interfacial tension between DCM and aqueous phase containing only PVA was $4.0 mN.m^{-1}$, whatever the concentration of PCL in DCM.

The Reynolds numbers Re indicated that the emulsions flowed in a turbulent manner since Re was higher than 10^4 ($Re = 1.0 \times 10^4$ and $Re = 1.9 \times 10^4$ for the marine propeller and the three blades propeller respectively). Since the flow was turbulent, the Weber number that is a dimensionless ratio of the initial forces to the interfacial forces was the relevant parameter to be considered as controlling the droplet sizes. The Weber numbers were high ($We = 950$ and $We = 3300$ for the marine propeller and the three blades propeller respectively), which indicated that the fragmentation of oil droplets by inertial forces was operative.

The droplet size depended on the viscosity of the oil dispersed phase η_D (Fig 5). Such viscosity dependence operates when the viscous oil resists against droplet fragmentation taking place during short collisions between droplets and turbulent eddies. In particular, the concentrated solution of PCL₈₀₀₀₀ in DCM gave large droplets because it was highly viscous. In the limit of large viscosity of the oil phase, Calabrese et al. (1986a) and Wang and Calabrese (1986) have shown that the droplet diameters varied as $\eta_D^{3/4}$. The viscosities of the emulsion oil phases were measured as reported in Table 3. For fluid oils, the droplet diameter is almost independent of the viscosity of the dispersed phase, in agreement with the large theoretical background developed under the assumption of inviscid oil conditions (Leng and Calabrese, 2004). The present experimental data followed these trends (Fig 5).

In the limit of low viscosity of the oil phase where the droplet diameter does not depend on η_D , the droplet diameter is related to the size of the turbulent eddies in a straightforward manner. Thus, the specific mean power dissipated in the emulsion of mass M is calculated from the characteristics of the impeller through its power number N_p as

$$\text{Mean specific power density: } \varepsilon = \frac{N_p \rho_c N^3 D^5}{M} \quad (8)$$

The mean specific power dissipated by the impeller was $\varepsilon = 0.06 W.kg^{-1}$ for the marine propeller using $N_p = 0.4$ (Kato et al., 2009) and $\varepsilon = 1.4 W.kg^{-1}$ for the three flat blades propeller using $N_p = 1.5$ (Bates et al., 1963). The size of the smallest turbulent eddies called Kolmogorov

microscale λ corresponds to the diameter of the largest droplets that could be fragmented by eddies

Kolmogorov microscale:
$$\lambda = \left(\frac{\eta_c^3}{\varepsilon \rho_c^3} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (9)$$

λ corresponds to the diameter of the largest droplet in the emulsion d_{\max} ; it is conveniently compared to the $d(90)$ of the droplet size distribution of the emulsion. It has been frequently observed that the mean Sauter diameter d_{32} and the maximum diameter d_{\max} were proportional (Calabrese et al., 1986b). Their ratio has been estimated from a compilation of experimental values as

$$d_{32} = 0.6 d_{\max} = 0.6 \lambda \quad (10)$$

As shown in Fig 5, the droplets diameter for oil phases of low viscosity indeed nicely agreed with the predictions based on the size of Kolmogorov eddies. An upwards departure at high oil viscosities was observed, which was compatible with the slope 3/4 inferred for highly viscous oil phases. The crossover from the low viscous behavior to the high viscosity regime took place at $\eta_D \approx 10$ mPa.s. At the end, the droplet sizes can be predicted from the stirring parameters of the process and the viscosities of the dispersed and continuous phases.

Table 3

Effect of the PCL concentration and molar mass on the organic phase viscosity.

PCL molar mass (Da)	PCL/DCM ratio (wt%)	Viscosity (mPa.s)
45,000	3.3	3.5 ± 0.1
45,000	10	30.8 ± 0.3
80,000	3.3	21.6 ± 0.2
80,000	10	528.5 ± 4

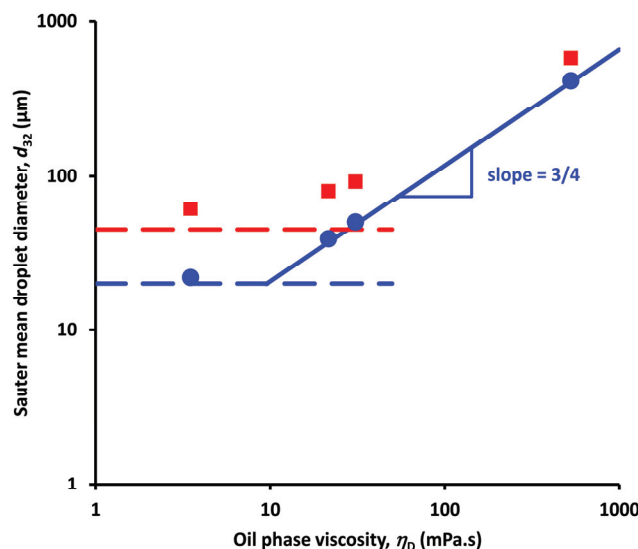


Figure 5. Variation of the mean droplet diameter d_{32} with respect to the viscosity of the oil phase η_D for the three flat blades propeller (blue circles) and the marine propeller (red squares). The dashed lines mark the prediction of the limiting droplet size for inviscid oil calculated from the Kolmogorov microscale (Eqs 6 and 7). The solid line of slope 3/4 is the limiting behavior for highly viscous oils.

3.5. Effect of the stirring process

The marine propeller was less powerful at emulsification than the three flat blades propeller, so that the emulsion droplets and microspheres were larger with the former impeller than the later (Table 1). That the lowest shear stresses caused the largest departure from the expected smooth surface state could be felt a paradoxical result. Indeed the emulsion droplets of large sizes resulting from low shear turned into microparticles with morphological deteriorations upon solvent evaporation. This is in accordance with previous works that have noticed such degradation but did not elucidate their origin (Dubernet et al., 1987). For the same formulation composition, the use of a marine propeller deteriorated the surface state to a larger extent than the three flat blades propeller. Using the marine propeller, scars, defects and holes were observed for the PCL₄₅₀₀₀ and rough microparticles were obtained for the PCL₈₀₀₀₀. Conversely, small microparticles with a smooth surface were obtained for PCL₄₅₀₀₀ at 3.3 wt% using the three flat blades propeller. It appeared clear from the present results that the coalescence taking place during the solvent evaporation stage was the main origin of surface defects. Since the stirring process was the same during emulsification and solvent evaporation, the stirrer probably played its role on the surface morphology of microparticles during solvent evaporation.

3.6. Effect of the polymer molar mass and concentration in the oil phase

The viscosity of the emulsion oil phase increased with respect to the PCL concentration and molar mass (Table 3), resulting in larger emulsion droplets and larger microparticles sizes as

reported in Figs 2 and 5. Such trends were in agreement with previous reports (Dubernet et al., 1987; Rodríguez et al., 1998; Youan et al., 2001; Lee et al., 2000).

The oil phase viscosity had a direct influence on the morphology. Indeed, microparticles surface states were smooth at low polymer concentration and high shear stirring both for PCL₄₅₀₀₀ and PCL₈₀₀₀₀. At higher polymer concentrations, degradations of the microparticles surface occurred, the final morphology depending on the PCL molar mass: the microspheres of PCL₄₅₀₀₀ showed scars, defects and holes whereas those of PCL₈₀₀₀₀ were characterized by rough surfaces (Fig 2). A PCL₄₅₀₀₀/DCM ratio of 20 wt% led to large particles of 136 μm with holes on their surface and their cross sections of freeze-fractured microparticles clearly showed wells connecting a void in the core and the external surface of the microparticles. The use of PCL₈₀₀₀₀ at the PCL/DCM ratio of 3.3 wt% caused the production of twice larger smooth microparticles as for PCL₄₅₀₀₀ at the same concentration. The large PCL₈₀₀₀₀/DCM ratios of 10 wt% and 20 wt% caused larger microspheres having increasingly rough surface states. It was noticed that for the highest PCL₈₀₀₀₀/DCM ratios (10 wt% and 20 wt%), the background of the video probe pictures recorded during the emulsification step was darker than for other samples. Such dark background revealed the presence of small droplets of sizes smaller than the resolution of the camera. As the evaporation proceeded, the background turned clearer and small microparticles could be observed on the surface of large microparticles (Fig 6). Such observations confirmed the coalescence of small droplets onto larger ones that led to the formation of a rough surface of the final microparticles in case of arrested coalescence.

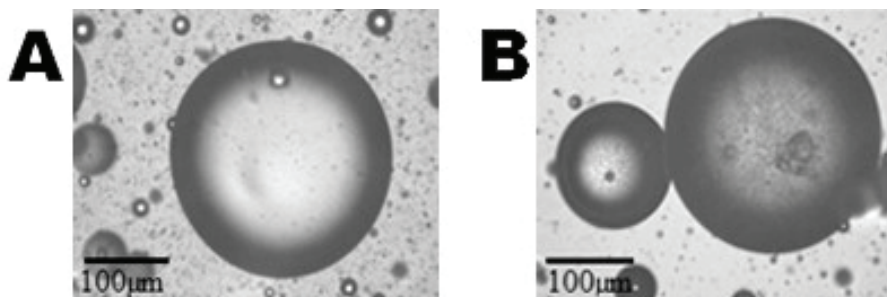


Figure 6. *In situ* pictures recorded with the video probe for the 80-10-PVA-T experiment: A: emulsification step, B: evaporation step.

3.7. Effect of the type of surfactant

As previously mentioned PVA and polysorbate 80 are commonly used stabilizers for oil in water emulsions in general and for the microencapsulation processes in particular. It is expected that a larger concentration of emulsifier causes the formation of smaller emulsion droplets. However, the addition of 1 wt% polysorbate 80 to the previous aqueous phase containing 1 wt% PVA resulted in an increase in the size of the primary emulsion (Fig 7A) and of the final microspheres (Fig 7B). In order to find a rationale to such a surprising behavior of polysorbate 80, interfacial tensions and partition coefficients of polysorbate 80 between water and DCM were measured. The interfacial tension between the PCL solution in DCM and the aqueous

phase containing 1 wt% polysorbate 80 was 16.4 mN.m^{-1} , lower than 29.1 mN.m^{-1} obtained without surfactant, but larger than the interfacial tension of 4.0 mN.m^{-1} obtained for an aqueous phase containing 1 wt% PVA alone (Table 4). The presence of polysorbate weakened the surface active properties of PVA since the interfacial tension measured for the mixed solution 1 wt% polysorbate 80 + 1 wt% PVA was 13.0 mN.m^{-1} . The partition coefficient of polysorbate 80 between water and DCM was 1.57 (Table 5). Thus for the present emulsions containing 10% oil phase, 15% of the full polysorbate 80 was present inside the oil droplets. On the contrary PVA was almost completely present in the aqueous phase. Polysorbate 80 was pretty soluble in DCM; the peculiar behavior of polysorbate 80 in o/w emulsions of DCM was probably caused by the large concentration of polysorbate 80 (1.35 wt%) in the oil phase. This is a specific behavior of DCM as an oil phase since polysorbate 80 is very often used as an emulsifier of o/w emulsions containing more common oils.

The consequence of using 1 wt% of polysorbate 80 and PVA was the formation of damaged microparticles morphologies regardless the composition of the organic phase or the agitation. Indeed, the surface state had irregular shapes with scars, defects, or holes for the PCL₄₅₀₀₀ microparticles and roughness for the PCL₈₀₀₀₀ microparticles (Fig 2). A typical morphology as dumbbells was also observed with the use of polysorbate 80 as supplementary emulsifier (45-10-P80-T). Such dumbbells are definitely the mark of an arrested coalescence phenomenon. Coalescence phenomena were observed *in situ* by the video probe in experiments using polysorbate 80 (Fig 4).

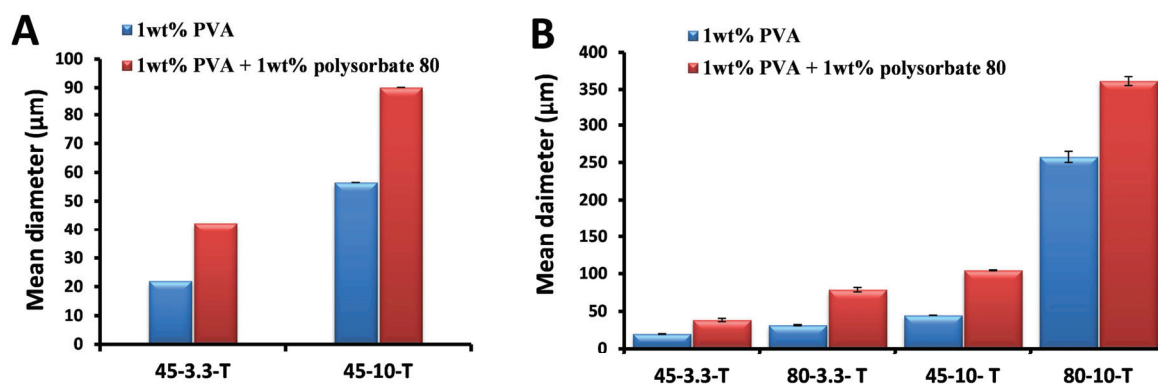


Figure 7. Effect of the addition of polysorbate 80 on the mean diameter of PCL microparticles: A: emulsion droplets; B: microparticles.

Table 4

Interfacial tensions between DCM and aqueous phases of different surfactant compositions.

	No surfactant	1 wt% polysorbate 80	1 wt% PVA + 1 wt% polysorbate 80	1 wt% PVA
Interfacial tension (mN.m ⁻¹)	29.1 ± 0.2	16.4 ± 0.1	13.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1

Table 5

Polysorbate 80 and PVA partition coefficient measurement between water and DCM.

	Polysorbate 80 (wt%)	PVA (wt%)
Water phase	38.6 ± 0.8	99.5 ± 0.8
DCM phase	60.6 ± 0.5	
Partition coefficient	1.57	5 × 10 ⁻³

3.8. *In vitro* drug release behavior of PCL microparticles

The influence of the PCL microparticles morphology on the bioavailability of drugs was assessed by drug release experiments from microparticles having different surface states. The PCL microparticles were loaded with 2 wt% of cholecalciferol (Table 6). Microparticles having their diameters of the same magnitude have been selected because drug release is obviously related to the specific area, that is, to the size of the microparticles (Sansdrap and Moës, 1993). The release behavior for the PCL₄₅₀₀₀ microparticles of 136 μ m with holes has been compared to microparticles with scars and defects of 132 μ m (Fig 8A). For the PCL₈₀₀₀₀ microparticles, the drug release from smooth and rough microparticles of 250 and 257 μ m respectively has been studied (Fig 8B). In every experiment a burst effect was observed followed by a slower drug release with different profiles depending on the morphology.

The *in vitro* cholecalciferol release behavior was modeled as a passive diffusion from the microparticles into the aqueous continuous phase using the Higuchi model. The cumulated amount of released drug Q increased as the square root of time as

$$Q = k_H t^{1/2} \quad (11)$$

where k_H is the Higuchi's rate constant (Dash et al., 2010). Indeed a plot of Q against $t^{1/2}$ (Fig 9) was linear during the first 10 h of the release process ($r^2 > 0.99$ in linear regressions), showing that the drug release took place by passive diffusion. The Higuchi rate constant k_H was calculated from the slope (Table 6). The drug release was faster for microparticles of PCL₄₅₀₀₀ with holes ($k_H = 3.4 \text{ wt\%.h}^{-1/2}$) than for those with scars and defects ($k_H = 1.6 \text{ wt\%.h}^{-1/2}$). The rough microparticles of PCL₈₀₀₀₀ resulted in faster release ($k_H = 1.0 \text{ wt\%.h}^{-1/2}$) than the smooth ones ($k_H = 0.53 \text{ wt\%.h}^{-1/2}$). The release kinetics departed from the $t^{1/2}$ -dependence for longer

times; such departure from Higuchi's behavior was an acceleration of drug release, showing that a supplementary release mechanism was operating for release durations longer than 10 h.

Table 6

Drug release experiments: microspheres size, drug loading, Higuchi's release rate constant, and surface state morphology.

Microparticle	Particle size (μm)	Drug loading capacity (wt%)	Encapsulation efficiency (%)	Higuchi rate constant, k_H ($\text{wt}\% \cdot \text{h}^{-1/2}$)	Morphological characteristics
45-10-PVA-M	132 ± 5	1.9 ± 0.1	79.6 ± 0.3	1.6	Surface state with scars and defects
45-20-PVA-T	136 ± 5	2.2 ± 0.1	84.4 ± 0.2	3.4	Surface state with holes
80-3.3-P80-M	250 ± 1	2.1 ± 0.1	82.5 ± 0.5	0.53	Relatively smooth surface state
80-10-PVA-T	257 ± 4	2.4 ± 0.1	89.7 ± 0.4	1.0	Rough surface state

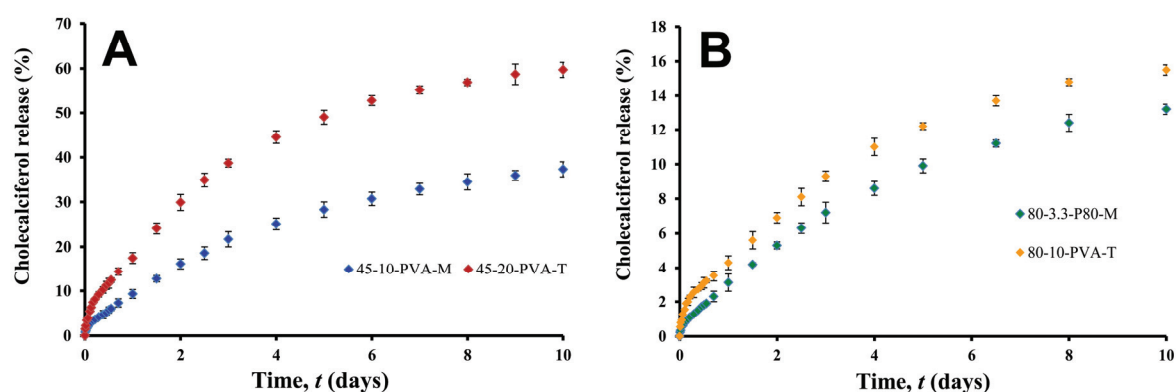


Figure 8. Release profiles of cholecalciferol from microspheres of different morphologies ($n = 3$): A: microspheres of PCL₄₅₀₀₀; B: microspheres of PCL₈₀₀₀₀.

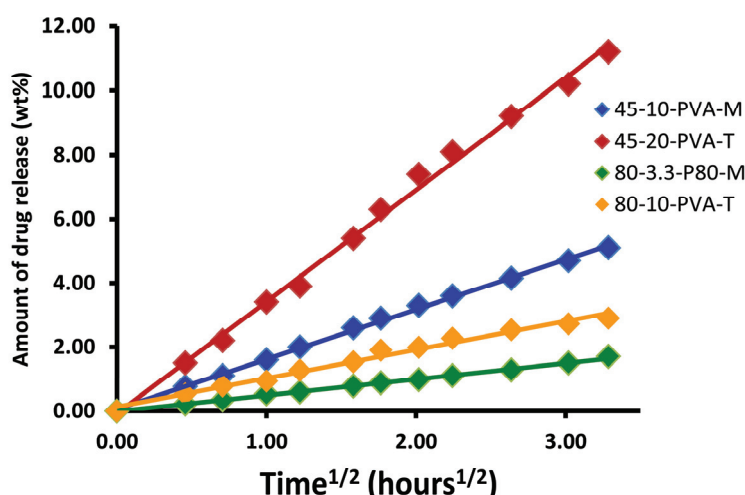


Figure 9. Results of the Higuchi's model applied on the drug release experiments.

4. General discussion

Few researches concerning the microspheres surface morphology prepared by means of the microencapsulation by the o/w emulsion/solvent evaporation process have been done although such morphology plays an important role in the final drug release profile (Le Ray et al., 2003; Kishida et al., 1990; Freidberg and Zhu, 2004; Yang et al., 2001). The present work has identified the key steps and the several parameters that control the final surface state for the commonly used PCL microparticles. Different morphologies of microparticles have been obtained: the surface state went from spherical and smooth to damaged (Table 2) depending on the process parameters and formulation. Scars and defects, holes as well as roughness were major morphologies raised in this work; they were corresponding to those reported in literature (Jeong et al., 2003; Dubernet et al., 1987; Suave et al., 2010; Dordunoo et al., 1995; Perez et al., 2000; Zhu et al., 2005). Departures from a smooth surface have often been termed as “damaged surface”. This is actually a misleading terminology since those different morphologies can be mastered in order to have a control over the drug delivery properties of the microparticles.

All phenomena of relevance regarding the surface morphology of microparticles took place during the solvent evaporation stage. Therefore, the two main hypothesized mechanisms driving the morphology of the particles were the rate of DCM evaporation relative to the rate of droplet coalescence, and the formation of a rigid crust of polymer at the surface of the drying droplets. Evidence of coalescence has been given by several experiments: rough and dumbbell morphologies of the microparticles, larger dry microparticles than expected on the basis of emulsion droplet sizes, and direct observation of coalescence events with the in situ video probe. Full coalescence led to smooth surface of the final microparticles. Arrested coalescence led to the formation of either rough surface morphologies or surface scars corresponding to

incomplete healing after arrested coalescence. Holes and cracks came from the rupture of a rigid crust of dry polymer that formed when the oil phase was highly viscous; large voids were left beneath the holes and cracks. All parameters that influence the rates of evaporation and coalescence are of relevance to the control of the morphology. It is noticed that such parameters also influence other phenomena that are not of relevance in the present case, so that bare correlations between physicochemical parameters and final results may be really misleading. The agitation process first, but also, the molar mass of PCL, the polymer concentration in the oil phase, and the use of various surfactants have been identified as playing a key role in the formation of irregularities at the surface. The present results have shown that coalescence during solvent evaporation was the major process of emulsion alteration. Owing to the rather high solubility of DCM in water, Ostwald ripening should obviously operate and it is difficult to figure out how much would be the contribution of Ostwald ripening. The emulsification stage yielded o/w emulsions that did not show so much specific behavior. O/w emulsions containing DCM in the oil phase were of poor stability because the emulsifier did not stabilize oil droplets to high efficiency. The PVA emulsifier has better been selected at optimum with regards to the stability of the final aqueous suspension of polymer microparticles and its tight binding to the surface of PCL microparticles for the emulsifier did not leach into the aqueous phase during utilization.

4.1. Influence of the solvent evaporation rate

The solvent evaporation rate was the main parameter that controlled the surface morphology. Solvent evaporation caused the hardening of the emulsion droplets. Fast hardening quenched transient morphologies of coalescence taking place throughout the solvent evaporation stage. The morphology was under control of the relative rates of coalescence and droplet hardening. It has been found that the solvent evaporation rate was mainly controlled by the type of agitation operating during the evaporation stage. The solvent evaporation rate was influenced by the diffusion of DCM out of the emulsion droplets only in extreme cases where the viscosity of the oil phase was very high. This is in accordance with previous works proving that by using fluid organic phases with lower polymer/solvent ratios the solvent removal was more uniform and faster compared to higher ratios (Li et al., 1995a).

4.2. Influences of polymer concentration and molar mass and impact of the agitation system on morphologies

The most obvious consequence of increasing the molar mass or concentration of PCL in the organic phase is an increase of the viscosity of the disperse emulsion phase. It is well-documented that the emulsification of viscous oil phases as o/w emulsions is difficult and results in oil droplets of very large size. However, the size of emulsion droplets was not a parameter of relevance in the present case since the various surface states form during the solvent evaporation stage as a result of the competition between coalescence and solvent

evaporation. Solvent evaporation rate was primarily controlled by the stirring rate, except for very viscous oil phases. Coalescence took place in every instance, even in cases where the final microparticles had a smooth surface.

Smooth surface states were obtained with small and fluid emulsion droplets through a low PCL mass or molar mass in the organic phase and through high shearing emulsification process (three flat blades propeller). In those cases coalescence of the fluid emulsion droplets could go to completion, leading to spherical droplets and smooth spherical dry microparticles.

Scars appeared as long lines going all around the particles, resulting in a shape looking as for an apricot. The surface states with *scars and defects* were observed for PCL₄₅₀₀₀ microparticles from 50 μm to 150 μm mean diameter obtained with an increase in the organic phase viscosity (ratio of 10 wt%) or with a decrease in the shear forces of the agitation system (marine propeller). Coalescence has been arrested because reshaping the emulsion droplets into smooth spheres after a starting coalescence event has been stopped by the early hardening of the droplets. This typical morphology found in the literature (Dubernet et al., 1987; Sato et al., 1988; Jalil et al., 1990; Jeong et al., 2003) showed two or more microparticles stuck together and flattened. Jeffery et al. (1991) argued that high organic phase viscosity obtained by increasing the polymer concentration may lead to an increased frequency of collisions, resulting in deteriorated morphologies with fusion of semi-formed particles as observed in the present work (45-10-PVA-T). The morphological damages referenced as scars and defects seemed to be the consequence of two or more droplets of same (scars) or different (defects) sizes undergoing coalescence together at an advanced stage of the evaporation and hardening without relaxing their shapes to spheres.

The *rough morphology* observed with viscous solutions of PCL₈₀₀₀₀ at 10 and 20 wt% concentration in DCM showed pieces of small particles stuck to the surface of large microspheres, giving particles looking as a raspberry. This type of morphology was also observed by Suave et al. (2010) with the same polymer. Applying the same deteriorations mechanism as the one used to explain the defects, the roughness of microparticles obtained from the viscous organic phase containing PCL₈₀₀₀₀ seemed to come from small microspheres stuck to the surface of a bigger one. Indeed very small droplets are often present in emulsions. They are formed during the emulsification process when droplets undergo fragmentation into several daughter droplets having the typical size of the turbulent eddies. Fragmentation of large droplets leaves very small satellite droplets in between the main daughter droplets. The formation of satellite droplets is particularly significant for viscous oil phases (Tcholakova et al., 2007). This hypothesis is in agreement with the observations realized *in situ* with the video probe presented on the Fig 5 showing a lot of small droplets in suspension before evaporation that could stick and undergo coalescence at the surface of larger particles at the end of the evaporation stage.

Surface states with holes were observed for the large microparticles above 150 μm obtained by the use of either a high PCL₄₅₀₀₀ concentration of 20 wt% or low shear agitation. Similar

morphologies have been found in the literature for microparticles using PCL as polymer matrix (Dordunoo et al., 1995; Perez et al., 2000; Dubernet et al., 1987; Zhu et al., 2005). Holes were presumed to be the result of cracks opened in a rigid crust of PCL formed at the surface of the particles before DCM evaporation reached completion. The formation of such a crust required a concentration gradient of DCM from the center to the surface of the oil droplets. The surface of the droplets depleted in DCM hardened before the DCM present in the core of the droplets could diffuse to the surface. A radial concentration gradient of DCM established inside the droplets when the oil phase was so viscous that the diffusion of DCM to the surface was slower than the evaporation rate of DCM. This is in good agreement with previous work showing that at high polymer concentration the organic phase exhibits an uneven distribution of solvent composition with a rapid hardening of the periphery of the microsphere creating a rigid cortical layer (Li et al., 1995a). As the evaporation of the solvent in the aqueous phase proceeded, a difference of osmotic pressure between aqueous and organic phase on both sides of the PCL progressively increased. The crust of dry PCL cracked when the stress caused by the osmotic pressure gradient was larger than the tensile strength of the crust. No hole was drilled for small microparticles because DCM diffused quickly to the surface. For larger microparticles a rigid layer containing low amounts of DCM formed at the surface, while the core of the microparticles still contained solvent that needed to be removed. As DCM is an organic solvent with a low vaporization enthalpy $\Delta_{\text{vap}}H$ of 27.98 kJ.mol⁻¹ and a boiling point of 39.9°C the solvent in the core can be partially or totally liquid or gaseous because the long time agitation process can heat the medium. To equilibrate the osmotic pressure, a crack generated a hole that allowed the internal gas and/or liquid DCM to reach the aqueous phase. The present SEM (45-20-PVA-T) and previous observations (Perez et al., 2000) performed on cross-sections of microspheres clearly showed a well which was the memory of the path by which the residual solvent core reached the aqueous phase. No hole was observed for the microparticles of PCL₈₀₀₀₀ because of the higher inherent tensile strength and the thicker surface crust of hardening droplets compared to the PCL₄₅₀₀₀.

4.3. *Effect of the interfacial stabilization*

Polysorbate 80 is often used to stabilize o/w emulsions in the emulsion/solvent evaporation process. Indeed the HLB 15 of polysorbate shows that it is a hydrophilic emulsifier that stabilizes o/w emulsions. It is demonstrated in accordance with previous studies that polysorbate 80 destabilizes the emulsion compared to the PVA and leads to bigger droplets and microsphere sizes (Table 4; Kim et al., 2005; Benoit et al., 1999). The results on Table 5 showed that during the emulsification a major part of the polysorbate 80 was solubilized in the DCM phase. Therefore, in accordance with the Bancroft rule (Bancroft, 1913 and 1915) polysorbate 80 should behave as an oil-soluble emulsifier that stabilizes w/o emulsions. Accordingly, the present o/w emulsions were destabilized by polysorbate 80. This is confirmed by the fact that the addition of polysorbate 80 destabilizes the emulsion by increasing the interfacial tensions

compared to the PVA alone (Table 4). As a consequence coalescence phenomena observed *in situ* by the video probe competed with the evaporation rate and resulted in damaged morphologies. Lee et al. (1999) and Kawashima et al. (1993) have shown that microspheres coalesced together when the rate of evaporation was too slow. They also showed that when the diffusion rate of solvent was too fast, the solvent might diffuse into the aqueous phase before stable emulsion droplets were formed, causing the aggregation of embryonic microsphere droplets. A typical morphology looking as dumbbells was obtained for microparticles sizes between 100 and 200 μm upon the use of polysorbate 80 as supplementary emulsifier. Dumbbells were not assumed to be representative of the PCL sticky behavior during the evaporation because the microparticles surface was not well defined. Dumbbells were the consequence of arrested coalescence that took place during the late stages of evaporation. Arrested coalescence was observed when DCM evaporation was slow enough for coalescence to take place, but high enough to freeze the coalescence process at its early stages. Thus arrested coalescence was again the result of a competition between the coalescence and the evaporation rate.

4.4. Impact of the surface state on the drug release rate

Drug release can take place by a burst release at very short times, by passive diffusion through the polymer matrix, or by erosion of the polymer material when it is biodegradable. Those phenomena take place on different time scales and the surface state of the microparticles may influence them in different ways. It has been shown that PCL degradation was slow in aqueous medium because of its semi-crystalline state and hydrophobic character (Ha et al., 1997, Lemmouchi et al., 1998). As a consequence, the presumed predominant mechanism of drug release is diffusion through the amorphous part of the polymer matrix (Perez et al., 2000). This hypothesis is correlated with previous results showing that the Higuchi model was valid, indicating diffusion-controlled release mechanism, following Fick's law. The microparticles surface state influences drug delivery in such instance (Yang et al., 2001).

A burst release is often reported in release kinetics from microencapsulated dosage forms. It is presumed being related to the drug located at the surface of the microparticles that is not retained by the encapsulation process (Yan et al., 1994). Such drug molecules are obviously deposited at the microparticles surface when the manufacture process involves a final drying step where drug molecules present in water stay in the dry product but there is no specific interaction with the microparticles. Such burst release of deposited molecules is observed as soon as the microparticles are redispersed in water. Besides, several possible mechanisms have been proposed as origins of a burst release. Heterogeneous radial distribution of drug within the microparticle or variation of the polymer material properties close to the microparticles surface are two of them. A heterogeneous structure is not mandatory for a burst release is observed however (Huang and Brazel, 2001). The possible burst release is always followed by a slower release stage due to the diffusion of drug into the dense polymer matrix (Spenlehauer et al.,

1984). In the present case the Higuchi behavior was followed since the first data point recorded after 12 min and the plot of the released amount as a function of $t^{1/2}$ nicely extrapolated to zero released amount. Such behavior demonstrated that there was no burst release and that the release at short times (less than 10 h) was caused by passive diffusion. The microparticles of PCL₄₅₀₀₀ having morphologies with holes did not show a burst release although large craters were present on their surface; showing that even a strongly damaged surface state did not cause encapsulation failure of part of the drug. They had a faster release profile than for the microparticles showing scars and defects however.

The diffusion controlled release following Higuchi model was strongly dependent on the morphology of microcapsules. This was revealed by the Higuchi rate constant k_H value twice higher or more for 45-20-PVA-T than for other microparticles. This is explained by the fact that holes increased the effective surface area of the microparticles promoting exchanges with the aqueous medium and a faster drug release (Gautier et al., 1998; Das et al., 1998). Moreover, characterization of the PCL₄₅₀₀₀ microparticles with holes showed that the polymeric matrix had macroporous internal and external structures. These interconnected craters enhanced the water penetration into the polymer matrix, the water-filled channels allowing cholecalciferol dissolution and diffusion to the external medium (Le Ray et al., 2003; Vasudev et al., 1997). The present results were in accordance with previous works showing that microparticles containing holes and pores allowed faster drug release compared to smoother ones (Freiberg and Zhu, 2004; Yang et al., 2001). For PCL₈₀₀₀₀, the rough microparticles resulted in faster release rate than smooth ones as revealed by their Higuchi's k_H values ~ 2 times higher. Indeed, roughness came from small microparticles stuck to the surface of larger ones during the evaporation step and subjected to arrested coalescence. The contact surface between such stuck microparticles left passages that did not heal forming interconnected channels in which water may easily penetrate, causing in an increase in the cholecalciferol release rate (Yang et al., 2001). As a whole, the accelerated release observed in the diffusion regime was caused by surface defects, but the kinetic release data alone cannot discriminate the mechanisms. Two main types of accelerated release operated: faster release because of large surface area coming from holes and the irregular shape, and fast release by diffusion through preferential diffusion paths corresponding to pores, defects and incompletely healed scars. The mechanism of release is passive diffusion in any case, so that the Higuchi's law is followed.

There was departure from the Higuchi's law for durations longer than 10 h. The drug release was faster than predicted from the Higuchi's law determined in the short release time regime. Therefore a supplementary phenomenon causing drug release was operating at long times. Since PCL is a biodegradable polyester, the hydrolysis of the polymer material was probably the origin of the accelerated release. It was indeed claimed that PCL biodegradable was slow and could be neglected in many instances (Ha et al., 1997, Lemmouchi et al., 1998). But the release experiments lasted for very long time, much longer than many experiments reported in the literature. It is therefore likely that the erosion of microparticles by hydrolysis of PCL was

the cause of accelerated drug release. Such erosion also depends on the morphology of the microparticles. Thus, the microparticles with holes (45-20-PVA-T) showed a larger acceleration at long times than all other microparticles. The effect of the surface morphology on the release driven by PCL erosion was not significantly different between other microparticles (scary, rough, smooth).

Therefore the effects of the surface morphology of microparticles was multifold since the surface morphology affected the surface area available for drug transfer to the aqueous solution, the diffusion through structural defects acting as preferential diffusion paths, and the erosion of the polymer material.

5. Conclusion

This study has demonstrated that the morphology of PCL microparticles was highly influenced by the formulation and process parameters of the emulsion-solvent evaporation process. The phenomenon controlling the surface morphology is the competition between droplet coalescence and solvent evaporation driving particles hardening. The picture that emerged from the present investigation is that the morphology of microparticles was controlled by the evaporation rate that represented the time during which the hardening droplets are prone to deformations. As a consequence, there is a competition between the solvent evaporation rate and the rate of the surface state modifications coming from coalescence of emulsion droplets. Fast evaporation enabling the production of smooth microparticles requires a low viscosity of the polymer solution in DCM and high shear rate agitation with efficient stabilizing surfactant. The main parameter of relevance was the stirring process, but other parameter pertaining to the formulation also mattered. The size and the viscosity of the primary emulsion were characteristics of high relevance. As a consequence, attention should be paid to the concentration and molar mass of the polymer in the oil phase, and the stabilization of the primary emulsion with appropriate surfactant. The impact of the surface state on the drug release has also been experimented with cholecalciferol loaded microparticles. It has been found that the surface state strongly influenced drug delivery by PCL microparticles. Thus this study highlighted the importance of the selection of appropriate conditions in order to obtain the desired morphology governing the drug delivery. It is worth noticing that in some works the use of viscous organic phase is necessary in order to increase the encapsulation efficiency (Rafati et al., 1997, Jeong et al., 2003, Kim et al., 2005). This constraint is a limitation that makes difficult to obtain small microparticles sizes with a smooth surface. As a consequence, under such conditions, the simultaneous control of the drug loading and of the microparticles morphology looks a difficult task. A suitable choice of the surface morphology is a way to control drug delivery.

Acknowledgments

This work was done thanks to the financial support from the Fond Unique Interministériel under the project FUI STABIPACK. The authors are also grateful to the help of Alain Rivoire and Jean-Marc Galvan for the use of the *in situ* video probe.

References

- Ach, D., Briançon, S., Broze, G., Puel, F., Rivoire, A., Galvan, J.-M., Chevalier, Y., 2015. Formation of microcapsules by complex coacervation, *Can. J. Chem. Eng.* 93, 183–192.
- Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L.P., Fessi, H., Briançon, S., 2013. Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation, *Pharm. Res.* 30, 1137–1146.
- Bancroft, W.D., 1913. The theory of emulsification V, *J. Phys. Chem.* 17, 501–519.
- Bancroft, W.D., 1915. The theory of emulsification VI, *J. Phys. Chem.* 19, 275–309.
- Bates, R.L., Fondy, P.L., Corpstein, R.R., 1963. An examination of some geometric parameters of impeller power, *Ind. Eng. Chem. Process Design Develop.* 2, 310–314.
- Benoit, J.-P., Courteille, F., Thies, C., 1986. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded poly(D,L-lactide) microspheres, *Int. J. Pharm.* 29, 95–102.
- Benoit, M.-A., Baras, B., Gillbard, J., 1999. Preparation and characterization of protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery, *Int. J. Pharm.* 184, 73–84.
- Brodkey, R.S., Hershey, H.C., 1988. *Transport Phenomena. A Unified Approach*, McGraw-Hill, New York, Chap 9.
- Calabrese, R.V., Chang, T.P.K., Dang, P.T., 1986a. Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors. Part I: Effect of dispersed-phase viscosity, *AIChE J.* 32, 657–666.
- Calabrese, R.V., Wang, C.Y., Bryner, N.P., 1986b. Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors. Part III: Correlations for mean size and droplet size distribution, *AIChE J.* 32, 677–681.
- Chung, T.W., Huang, Y.Y., Liu, Y.Z., 2001. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLLA microspheres, *Int. J. Pharm.* 212, 161–169.
- Das, S.K., Das, N.G., 1998. Preparation and in vitro dissolution profile of dual polymer (Eudragit™ RS100 and RL100) microparticles of diltiazem hydrochloride, *J. Microencapsulation* 15, 445–452.
- Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., Chowdhury, P., 2010. Kinetic modeling of drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol. Pharm.* 67, 217–223.
- Dash, T.K., Konkimalla, V.B., 2012. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review, *J. Control. Release* 158, 15–33.
- Dhanarajua, M.D., Sathyamoorthya, N., Sundar, V.D., Suresh, C., 2010. Preparation of poly(ϵ -caprolactone) microspheres containing etoposide by solvent evaporation method, *Asian J. Pharm. Sci.* 5, 114–122.

Dordunoo, S.K., Jackson, J.K., Arsenault, L.A., Oktaba, A.M., Hunter, W.L., Burt, H.M., 1995. Taxol encapsulation in poly (ϵ -caprolactone) microspheres, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36, 279–282.

Dubernet, C., Benoit, J.P., Couarraze, G., Duchêne D., 1987. Microencapsulation of nitrofurantoin in poly(ϵ -caprolactone): tableting and in vitro release studies, *Int. J. Pharm.* 35, 145–156.

Foss, W.R., Anderl, J.N., Clausi, A.L., Burke P.A., 2009. Diffusivities of dichloromethane in poly(lactide-co-glycolide), *J. Appl. Polym. Sci.* 112, 1622–1629.

Freiberg, S., Zhu X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release, *Int. J. Pharm.* 282, 1–18.

Gagnière, E., Mangin, D., Puel, F., Rivoire, A., Monnier, O., Garcia, E., Klein, J.-P., 2009. Formation of co-crystals: kinetic and thermodynamic aspects, *J. Cryst. Growth* 311, 2689–2695.

Gautier, H., Guicheux, J., Grimandi, G., Faivre, A., Daculsi, G., Merle, C., 1998. In vitro influence of apatite-granule-specific area on human growth hormone loading and release, *J. Biomed. Mater. Res.* 40, 606–613.

Girault, H.H., Schiffrin, D.J., Smith, B.D.V., 1984. The measurement of interfacial tension of pendant drops using a video image profile digitizer, *J. Colloid Interface Sci.* 101, 257–266.

Gonnet, M., Lethuaut, L., Boury, F., 2010. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins, *J. Control. Release* 146, 276–290.

Gross, C., Stamey, T., Hancock, S., Feldman, D., 1998. Treatment of early recurrent prostate cancer with 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol), *J. Urol.* 159, 2035–2039.

Gupta, K.C., Kumar, M.N.R., 2001. pH dependent hydrolysis and drug release behavior of chitosan/poly(ethylene glycol) polymer network microspheres, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12, 753–759.

Ha, J., Kim, S., Han, S., Sung, Y., Lee, Y., 1997. Albumin release from bioerodible hydrogels based on semi-interpenetrating polymer networks composed of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) macromer, *J. Control. Release* 49, 253–262.

Huang, X., Brazel, C.S., 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *J. Control. Release* 73, 121–136.

Huang, Y., Li, L., Fang, Y.E., 2010. Self-assembled particles of N-phthaloylchitosan-g-polycaprolactone molecular bottle brushes as carriers for controlled release of indometacin, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 557–565.

Izumikawa, S., Yoshioka, S., Aso, Y., Takeda, Y., 1991. Preparation of poly(l-lactide) microspheres of different crystalline morphology on drug release rate, *J. Control. Release* 15, 133–140.

Jalil, R., Nixon, J.R., 1990. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid) III: effect of the polymer molecular weight on the microcapsule properties, *J. Microencapsulation* 7, 41–52.

Jeffery, H., Davis, S.S, O'Hagan, D.T., 1991. The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation, *Int. J. Pharm.* 77, 169–175.

Jeong, J.C., Lee, J., Cho, K., 2003. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Release* 92, 249–258.

Jeyanthi, R., Mehta, R.C., Thanoo, B.C., DeLuca, P.P., 1997. Effect of processing parameters on the properties of peptide-containing PLGA microspheres, *J. Microencapsulation* 14, 163–174.

Kato, Y., Tada, Y., Takeda, Y., Hirai, Y., Nagatsu, Y., 2009. Correlation of power consumption for propeller and Pfaudler type impellers, *J. Chem. Eng. Jpn* 42, 6–9.

Khalil, A., Puel, F., Chevalier, Y., Galvan, J.-M., Rivoire, A., Klein, J.-P., 2010. Study of droplet size distribution during an emulsification process using in situ video probe coupled with an automatic image analysis, *Chem. Eng. J.* 165, 946–957.

Khalil, A., Puel, F., Cosson, X., Gorbachev, O., Chevalier, Y., Galvan, J.-M., Rivoire, A., Klein, J.-P., 2012. Crystallization-in-emulsion process of a melted organic compound: in situ optical monitoring and simultaneous droplet and particle size measurements, *J. Cryst. Growth* 342, 99–109.

Kim, B.K., Hwang, S.J., Park, J.B., Park, H.J., 2005. Characteristics of felodipine-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Microencapsulation* 22, 193–203.

Kishida, A., Dressman, J.B., Yoshioka, S., Aso, Y., Takeda Y., 1990. Some determinants of morphology and release rate from poly(L)lactic acid microspheres, *J. Control. Release* 13, 83–89.

Lake, C.B., Rowe, R.K., 2004. Volatile organic compound diffusion and sorption coefficients for a needle-punched GCL, *Geosynth. Int.* 11, 257–272.

Lee, J.H., Park, T.G., Choi, H.K., 2000. Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method, *Int. J. Pharm.* 196, 75–83.

Lemmouchi, Y., Schacht, E., Kageruka, P., De Deken, R., Diarra, B., Dially, O., Geerts, S., 1998. Biodegradable polyesters for controlled release of trypanocidal drugs: In vitro and in vivo studies, *Biomaterials* 19, 1827–1837.

Leng, D.E., Calabrese, R.V., 2004. Immiscible liquid-liquid systems, In *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*, Paul, E.L., Atiemo-Obeng, V.A., Kresta, S.M., Eds, Wiley-Interscience, Hoboken New Jersey, Chap. 12, pp. 639–753.

Le Ray, A.-M., Chiffolleau, S., Iooss, P., Grimandi, G., Gouyette, A., Daculsi, G., Merle, C., 2003. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility, *Biomaterials* 24, 443–449.

Li, W.I., Anderson, K.W., DeLuca, P.P., 1995a. Kinetic and thermodynamic modeling of the formation of polymeric microspheres using solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Release* 37, 187–198

Li, W.I., Anderson, K.W., Mehta, R.C., DeLuca, P.P., 1995b. Prediction of solvent removal profile and effect on properties for peptide loaded PLGA microspheres prepared by solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Release* 37, 199–214.

Li, M., Rouaud, O., Poncelet, D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches, *Int. J. Pharm.* 363, 26–39.

Lin, W.J., Huang, L.I., 2001. Influence of pluronics on protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles, *J. Microencapsulation* 18, 191–197.

Mateovic, T., Kriznar, B., Bogataj, M., Mrhar, A., 2002. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres, *J. Microencapsulation*, 19, 29–36.

O'Donnell P.B., McGinity J.W., 1997. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28, 25–42.

Perez, M.H., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Astier, A., Hoffman, M., Bodmeier, R., Maincent, P., 2000. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both lipophilic and hydrophilic drug, *J. Control. Release* 65, 429–438.

Petriz, E., Tritthart, T., Wintersteiger, R., 2006. Determination of phylloquinone and cholecalciferol encapsulated in granulates formed by melt extrusion, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 69, 101–112.

Rafati, H., Coombes, A.G.A., Adler, J., Holland, J., Davis, S.S., 1997. Protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics, *J. Control. Release* 43, 89–102.

Rodriguez, M., Vila Jato, J.L., Torres, D., 1998. Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region, *J. Control. Release* 55, 67–77.

Roustan, M., 1991. Agitation. Mélange. Caractéristiques des mobiles d'agitation, *Les Techniques de l'Ingénieur*, A5902.

Roy, S., Pal, M., Gupta, B.K., 1992. Indomethacin-loaded microspheres: design and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation. *Pharm. Res.* 9, 1132–1136.

Sansdrap, P., Moës, A.J., 1993. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres, *Int. J. Pharm.* 98, 157–164.

Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H.G., DeLuca, P.P., 1988. Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. Part 1. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques, *Pharm. Res.* 5, 21–30.

Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., 2004. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *Int. J. Pharm.* 278, 1–23.

Spenlehauer, G., Vert, M., Benoit, J.-P., Chabot, F., Veillard, M., 1988. Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: Morphology and release characteristics, *J. Control. Release* 7, 217–229.

Suave, J., Dall'Agnol, E.C., Pezzin, A.P.T., Meier, M.M., Silva, D.A.K., 2010. Biodegradable microspheres of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ϵ -caprolactone) loaded with Malathion pesticide: preparation, characterization, and in vitro controlled release testing, *J. Appl. Polym. Sci.* 117, 3419–3427.

Tcholakova, S., Vankova, N., Denkov, N., Danner, T., 2007. Emulsification in turbulent flow: 3. Daughter drop-size distribution, *J. Colloid Interface Sci.* 310, 570–589.

Vasudev, S.C., Chandy, T., Sharma, C.P., 1997. Development of chitosan/polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin-heparin for preventing cardiovascular thrombosis, *Biomaterials* 18, 375–381.

Wang, C.Y., Calabrese, R.V., 1986. Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors. Part II: Relative influence of viscosity and interfacial tension, *AIChE J.* 32, 667–676.

Wiscke, C., Schwendeman, S.P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *Int. J. Pharm.* 364, 298–327.

Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.*, 35 1217–1256.

Yan, C., Resau, J.H., Hewetson, J., West, M., Rill, W.L., Kende, M., 1994. Characterization and morphological analysis of protein loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique, *J. Control Release* 32, 231–241.

Yang, Y.Y., Chung, T.S., Ng, N.P., 2001. Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials* 22, 231–241.

Youan, B.B.C., Jackson, T.L., Dickens, L., Hernandez, C., Owusu-Ababio, G.J., 2001. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsules containing an oily core, *J. Control. Release* 76, 313–326.

Zhang, J.X., Zhu, K.J., Chen, D., 2005. Preparation of bovine serum albumin loaded poly (d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres by a modified phase separation technique, *J. Microencapsulation* 22, 117–126.

Zhu, K.J., Li, Y., Jiang, H.L., Yasuda, H., Ichimaru, A., Yamamoto, K., Lecomte, P., Jerome, R., 2005. Preparation, characterization and in vitro release properties of ibuprofen-loaded microspheres based on polylactide, poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers, *J. Microencapsulation* 22, 25–36.

Résumé des résultats principaux

Ce travail de recherche a permis d'identifier les causes et les mécanismes physico-chimiques responsables des dégradations morphologiques des microparticules de poly(ϵ -caprolactone) réalisées par microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple. Trois détériorations morphologiques ont été investiguées à savoir : les cicatrices et les défauts, les particules rugueuses ainsi que celles trouées.

- *Morphologies avec des cicatrices et des défauts ainsi que de la rugosité*

Pour ce qui est des cicatrices et des défauts ainsi que de la rugosité il a été déterminé qu'il existe une compétition entre la vitesse d'évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes d'émulsion et les phénomènes de coalescence qui sont responsables des états de surface détériorés. Ainsi, lorsque la cinétique d'évaporation est rapide (0,8 à 0,9 g/min) la morphologie est figée rapidement ce qui limite les phénomènes de coalescence résultant en des particules lisses. Il a été démontré que l'obtention de molécules lisses est la conséquence d'une phase organique fluide (3,5mPa.s à 21,6mPa.s) et d'une agitation cisailante (tripâle droite à 860rpm) permettant d'obtenir des gouttelettes d'émulsion de petites tailles (20 à 45 μ m). En effet, de par une surface de contact plus importante et une distance diffusionnelle qui diminue, les gouttelettes d'émulsion de petites tailles assurent une évaporation rapide. Il se produit alors un durcissement prompt qui limite ainsi les phénomènes de coalescence et par extension les dégradations morphologiques. Dans le cas d'une évaporation lente (<0,70g/min), des phénomènes de coalescence se produisent et sont limités par l'évaporation en cours qui solidifie l'interface de gouttelettes partiellement fusionnées. Ceci résulte en des morphologies dégradées tels que les cicatrices et les défauts ou les particules rugueuses. Les cicatrices et les défauts sont la conséquence de la coalescence limitée d'un nombre restreint de particules de tailles similaires tandis que la rugosité résulte de la coalescence limitée de nombreuses gouttelettes de petites tailles (< 10 μ m) à la surface de grosses (> 530 μ m).

Les tensioactifs utilisés pour stabiliser l'interface de l'émulsion ont également prouvé avoir un impact sur la morphologie finale. L'utilisation de polysorbate 80 notamment a démontré augmenter les phénomènes de coalescence. Ceci est expliqué par une tendance du

polysorbate 80 à former une émulsion inverse de par une affinité importante avec le dichlorométhane (règle de Bancroft).

- *Etats de surface trouée*

Les états de surface trouée, obtenus pour des phases organiques visqueuses ($\geq 30,8\text{mPa.s}$) ont été attribués au cœur de dichlorométhane liquide qui perce la croute externe solidifiée afin d'équilibrer les pressions osmotiques.

Partie expérimentale

Chapitre II:

*Réalisation de films antimicrobiens
contenant des microparticules pour
l'obtention d'une forme à libération
prolongée*

Introduction

Dans un contexte actuel polémique concernant la présence de conservateurs au sein des formulations cosmétiques, l'utilisation de conditionnements primaires antimicrobiens efficaces représente une solution technologique mais également un véritable challenge. L'objectif de cette étude est de réaliser un conditionnement primaire fonctionnalisé possédant des propriétés antimicrobiennes afin de renforcer l'action conservatrice au sein de la formulation à des endroits ciblés, propices à la contamination. La contrainte principale inhérente à cette étude est d'obtenir une libération de l'agent antimicrobien sur des durées longues permettant la protection du produit durant sa durée de vie. Pour cela, l'agent antimicrobien a été encapsulé et les microparticules ont été intégrées par enduction grâce à un liant à la surface du conditionnement primaire polyoléfine. Cette technique de fonctionnalisation a été sélectionnée car elle est simple à mettre en place [Scriven, 1988] et permet d'éviter une éventuelle dégradation de l'agent antimicrobien causée par les températures élevées d'extrusion ou de moulage par injection haute température [Suppakul et al., 2003 ; Han et al., 1999]. Cependant, les travaux de la littérature utilisent majoritairement le procédé d'enduction de films antimicrobiens avec l'agent antimicrobien non encapsulé et directement dispersé au sein du liant [An et al., 2000 ; Sayanjali et al., 2011; Möller et al., 2004; Lee et al., 2003]. L'utilisation d'un film contenant des microparticules est donc un procédé peu étudié représentant une solution innovante et prometteuse afin d'obtenir une libération contrôlée et prolongée dans le temps [Appendini et Hotchkiss, 2002 ; Guiga et al., 2009].

Afin de répondre à l'objectif de cette étude, des microparticules de polyméthacrylate de méthyle chargées en alcool phényléthylique ont été déposées à la surface de plaques polyoléfines grâce à un liant par le procédé de revêtement par immersion (*dip-coating*). L'impact de la viscosité de la dispersion liante ainsi que de la vitesse de retrait des plaques de polyoléfines sur l'épaisseur de couche déposée a été étudié. De plus, la concentration des microparticules contenues dans les films minces a été mesurée en fonction des paramètres du procédé de revêtement par immersion. L'état de surface des couches minces enduites sur les plaques de polyoléfine a été observé par microscopie électronique à balayage permettant de caractériser l'éventuelle présence de fissures ou de trous ainsi que la répartition et disposition des microparticules.

Les cinétiques de libération de l'agent antimicrobien qu'est l'alcool phényléthylique ont été mesurées pour différentes épaisseurs de film déposé permettant de moduler la surface de contact des microparticules avec le milieu extérieur. Afin d'observer uniquement l'effet de l'épaisseur du film sur la cinétique de libération, les plaques ont été fonctionnalisées avec la même quantité de microparticules. De plus, une plaque enduite d'un film contenant l'agent antimicrobien non encapsulé, dispersé au sein du liant a été utilisée à titre comparatif afin de déterminer l'impact de l'encapsulation sur la libération de l'alcool phényléthylique.

Ce travail, présenté sous forme de publication, a été accepté pour publication dans le journal *Drug Development and Industrial Pharmacy*.

Références

- [An et al., 2000] An D., Kim Y., Lee S., Paik H., Lee D., 2000. Antimicrobial low density polyethylene film coated with bacteriocins in binder medium, Food Science and Biotechnology, 9, 14–20
- [Appendini et Hotchkiss, 2002] Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. Innov Food Sci Emerg Technol 2002, 3, 113–126.
- [Guiga et al., 2009] Guiga W, Galland S, Peyrol E, Degraeve P, Carnet-Pantiez A, Sebti I. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 10, 203–207.
- [Han et Floros, 1999] Han J.H., Floros J.D., 1999. Modeling antimicrobial activity loss of potassium sorbate against Baker's yeast after heat process to develop antimicrobial food packaging materials, Food Sci. Biotechnol., 8, 11-14.
- [Lee et al., 2003] Lee C.H., An D.S., Park H.J., Lee D.S., 2003. Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating, Packaging Technology and Science, 16, 99–106
- [Möller et al., 2004] Möller H., Grelier S., Pardon P., Coma V., 2004. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 6585–6591
- [Sayanjali et al., 2011] Sayanjali S., Ghanbarzadeh B., Ghiassifar S., 2011. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic Aspergillus species in fresh pistachios, LWT – Food Science and Technology, 44, 1133–1138
- [Scriven, 1988] Scriven L.E., 1988. Physics and applications of dip coating and spin coating. Mater. Res. Soc. Symp. Proc., 121, 717–729.
- [Suppakul et al., 2003] Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger S.W., 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. J. Food Sci., 68, 408–420.

Antimicrobial films containing microparticles for the enhancement of long term sustained release

Jessica Bile, Marie-Alexandrine Bolzinger, Jean-Pierre Valour, Hatem Fessi, Yves Chevalier*

Université de Lyon, F-69008 Lyon, France; Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS 5007, 69622 Villeurbanne, France

Abstract

Coated packagings with thin films containing antimicrobial agents are an alternative technology to ensure the protection of products against microbial contaminations. Indeed, they allow lowering the antimicrobial concentration in the bulk of the product while meeting the safety requirements and the growing consumer demand for low preservative concentrations. Microencapsulation is a suitable way for controlling active agent release and providing a long term activity. This work aims at combining both technical solutions with coatings containing antimicrobial microparticles for the achievement of long term sustained release. Polyethylene surfaces were functionalized with microparticles of poly(methyl methacrylate) (PMMA) loaded with phenylethyl alcohol (PEA) as antimicrobial agent by the dip coating process using a polyurethane binder. The release of PEA into water from coated polyethylene surfaces and from PMMA microparticles was investigated to assess the sustained release and its mechanisms. Films with various thicknesses of 400-1000 μm containing antimicrobial microparticles demonstrated unusual long term release longer than 3 months. The diffusion of the antimicrobial agent through PMMA was the rate limiting step of the sustained release. PEA release increased as the contact area of the protruding microparticles with the external medium increased and the thickness of the film decreased. Such antimicrobial agents encapsulated inside thin coatings are promising with regards to antimicrobial preservation of products along their full shelf-life.

Keywords: controlled release, antimicrobial packaging, microencapsulation, dip-coating, organic coating, preservative

Introduction

Antimicrobial agents are used as preservatives in numerous fields and particularly in pharmaceuticals, cosmetics and foods formulations^{1,2,3}. They avoid the product spoilage due to contaminations by microorganisms, thereby extending the product shelf-life and protecting the consumer from potential infections from pathogens. Usual preservatives of chemical and natural origins might cause allergy or contact sensitization^{4,5,6,7}. The growing suspicion of consumers regarding the safety of preservatives drives the research which is now focused on the development of preservative-free or self-preserving products⁸. As an alternative, protection against microbial contamination can be ensured by excipients that have an antimicrobial activity but that are not registered as preservatives. The phenylethyl alcohol (PEA) meets these criteria

because it is the major component of the rose that is usually added in formulations as perfume but it has been proved to bring about a bacteriostatic effect^{9,10}. It has been observed that the bactericidal action of PEA is associated with cytological changes including membrane damage, especially in Gram-negative species. Thus it could be used as antimicrobial agent without being registered as preservatives in the regulations as it causes a rapid and irreversible breakdown in the permeability barriers of bacterial cells for a large variety of formulations such as O/W and W/O emulsions and aqueous systems¹¹.

Packagings enable the protection of products from harmful agents coming from outside by inhibiting or limiting the contact with oxygen, light, humidity and microorganisms. In this way, they decrease the possible product degradation, increase the shelf-life and ensure the product safety¹². Active packagings are an innovative recent concept in which the packaging, the product, and the environment interact to enhance formulation properties¹³. The development of active packagings with antimicrobial properties is gaining interest in several fields because it extends the product shelf-life and reduces the demand for preservatives in the bulk of the products, thus answering the consumer demand for low preservative concentration or their absence in the products¹⁴. Antimicrobial packagings can be achieved by several techniques such as the direct incorporation or immobilization of antimicrobial agent or the surface modifications and surface coatings of polyolefin container¹⁵. Coating the surface of the packaging with an antimicrobial formulation is of easy implementation¹⁶. Moreover compared to the direct introduction of the antimicrobial agent in the polyolefin, coating avoids the possible preservative degradation caused by the high temperatures of the packaging manufacturing process by extrusion or molding^{17,18}. As a consequence, packaging coating processes keep the integrity of the antimicrobial substance and enable the incorporation of a large variety of preservatives regardless their thermal stability¹⁹.

The control over the diffusion of the antimicrobial agent during the utilization is a crucial issue. Indeed, the efficiency of the protection during the product shelf-life includes the master of the release rate such that its concentration is above the minimal inhibitory concentration (MIC)^{20,21,22}. The nature and thickness of the coated polymeric film are important parameters that impact the release and thus the activity against microorganisms. Ofori-Kwakye and Fell²³ and Marvola et al.²⁴ proved that the release of pharmaceutical drugs decreased with the increase of the film thickness. Marvola et al.²⁴ also demonstrated that the ibuprofen release was dependent on the chemical nature of the binder.

Microencapsulation of active agents has been used in several fields for controlling active agent release. The use of a binder combined with microparticles is promising as it may enable the controlled and sustained release of the antimicrobial agent^{15,25}. Nevertheless to the best of our knowledge, this subject is poorly addressed in the literature compared to the direct incorporation of antimicrobial agent in the binder^{26,27,28,29}.

The aim of this work focused on this innovative technology is to create a film at the polyolefin surface containing microparticles loaded with PEA in order to obtain antimicrobial long term sustained release. The polymer used for the microparticles matrix is poly(methyl methacrylate) and the binder is composed of polyurethane, both are biocompatible polymers allowing applications in products intended to be in the contact with the human skin. They are also non-biodegradable leading to a release over time which is appropriate with the long period of use after opening.

In the first part, the formulation parameters for the coating and the resulting film characterization are discussed. In the second part, the release from different antimicrobial systems are measured and compared.

Materials

Poly(methyl methacrylate) (PMMA) polymer with number-average molar mass $M_n = 65,000$ Da was obtained from Lucite International. Poly(vinyl alcohol) (PVA) with an hydrolysis range of 86.7-88.7% and mass-average molar mass $M_w = 31,000$ Da and dichloromethane (DCM) of reagent grade were purchased from Sigma-Aldrich. Phenylethyl alcohol (PEA) was obtained from SFA. Polyethylene substrates were supplied in the form of extruded films by Albea. Polyurethane binder supplied under the trademark Emuldur 360A and sodium di(ethylhexyl)sulfosuccinate wetting agent called Lumiten I-SC were supplied by BASF. Blend of acacia Senegal gum and xanthan gum was purchased from Seppic as Solagum AX. All other chemicals were reagent grade and used as supplied.

Methods

Preparation of microspheres

Microparticles of PMMA loaded with PEA were prepared by the emulsion - solvent evaporation process³⁰. In a first step, an oil-in-water (o/w) emulsion was prepared. The aqueous phase (300 g) contained 1 wt% of PVA as stabilizer. The organic phase was a solution of 10 g of PMMA and 6 g of PEA dissolved in 30 g of dichloromethane (DCM). The emulsification was performed by pouring the organic phase in the aqueous phase under stirring with a three flat blades propeller of 40 mm diameter at the speed rate of 860 rpm. Then, the formulation was left 4 h under the same stirring conditions at room temperature and atmospheric pressure to allow for the DCM evaporation. The resulting solid microspheres were filtered and air-dried overnight at room temperature.

Particle size analysis

The size distributions of emulsion droplets and microspheres were characterized by laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern, UK) with pure water as dilution medium. The Fraunhofer theory was used for the calculation of the particle size distribution with a refractive index for the PMMA microparticles of 1.49³¹. Results were averages of triplicate measurements for each batch. Particle size distribution were expressed as the average of the mean equivalent volume diameter $d(50)$ given with the range represented by $d(10)$ and $d(90)$.

Determination of phenylethyl alcohol content

The PEA content was measured by a direct method consisting in titration of PEA after extraction from the microparticles or the coating^{32,33}. Either 100 mg of microparticles or 200 mg of films were immersed in 10 mL of methanol, the mixture was left for 5 h under stirring and filtered through a 0.45 μm syringe filter. The samples were analyzed for PEA content using a 6850 gas chromatography (GC) from Agilent (France) composed of an automatic injector, an

apolar column DB-1 (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) and a flame ionization detector (FID). The injector temperature was set at 270°C and the detector at 300°C. The temperature gradient in the oven was set from 100°C to 170°C at 10 °C.min⁻¹ and gave a retention time of 4.3 min for the PEA. The calibration curve for quantitative analysis was linear from 1.0.10⁻⁵ g/g to 1.0.10⁻³ g/g ($r^2 = 0.999$). The antimicrobial agent loading was expressed as the detected PEA to microspheres mass ratio. For the release experiments, the calibration curve was realized with a 50/50 wt% blend of water and methanol.

Deposition of films by dip coating

The substrates were polyethylene strips with dimensions 2.2 cm × 6.5 cm × 0.4 mm. They were washed with ethanol 1 h before dipping. The polyurethane binder chosen in this study form the film on the substrate under drying at atmospheric pressure and room temperature. In order to modify the viscosity of the dipping suspension from 40 to 135 mPa.s, the concentration of thickening agent (blend of acacia Senegal gum and xanthan gum known as Solagum AX) varied from 0 to 0.15 wt%. For the study of the coating parameters on the film properties, the coating suspension was composed of 48.5 wt% of microparticles and 48.5 wt% of binder. For the release studies films contained the same quantity of PEA, 9.3 mg, in order to focus on the influence of the film thickness parameter on the release kinetics. This later quantity was experimentally checked using the previous described HPLC method. In this case, the coating suspension was composed of different amounts of microparticles depending on the film referenced in Table 1.

Table 1. Formulation parameters of the coating suspension for films used in the APE release experiments.

Mean film thickness (μm)	Viscosifying agent (wt%)	Viscosity of the dipping suspension (mPa.s)	Microparticles content (wt%)	Binder content (wt%)	Wetting agent (wt%)
457.8 ± 23.6	0.052	55.3	0	97	3
455.3 ± 55.1	0	40.1	48.5	48.5	3
750.8 ± 45.2	0.07	81.2	26.5	70.5	3
879.6 ± 32.5	0.15	122.5	20.5	76.5	3

The dip coating device was composed of a stepping motor adjustable by computer software. It controlled a vertical support mounted on a vertically guide gliding unit allowing the substrate to be withdrawn vertically in the binder suspension. This experimental design enabled the speed adjustment that ensured the replication and good repeatability of the coatings. The withdrawal speed varying from 0.044 m.s⁻¹ to 0.44 m.s⁻¹. Substrates were dried horizontally in order to obtain a homogeneous film thickness. The drying was realized at ambient temperature for 4 h. The deposit height was 2.55 cm.

Characterization of coatings

Film thickness was measured with a radial receding steel dial mechanical comparator of 10 mm capacity with a precision of 5×10⁻⁴ mm. The film thickness was taken as the mean of 10 measurements per film realized at the top, the middle and the bottom of the film.

Determination of the PEA content was performed by introducing the film in 5 mL of methanol. The suspension was stirred at 500 rpm during 12 h in order to disperse the film in methanol allowing full solubilization of PEA in methanol. The suspension was filtered through a 0.45 μm membrane filter and analyzed by GC with the previously mentioned method.

Surface morphology

Microparticles and films shape and surface state were studied using scanning electron microscopy (SEM) (Neoscope, JCM-5000, JEOL, Japan). For the microparticles analysis: 10 mg of dried microparticles were suspended in 5 mL of ultra-pure water. A drop of this suspension was deposited on a double-sided adhesive tape fixed onto aluminum stub and dried. Both samples of microparticles and film were vacuum coated with a 20 nm thickness platinum film under an argon atmosphere. Samples were observed with SEM using an accelerating voltage of 10 kV in high vacuum mode.

Phenylethyl alcohol release experiments

Antimicrobial agent release from functionalized packagings or microparticles were measured by immersing different films or 100 mg of microparticles in 6 mL of pure water in order to obtain a final concentration of approximatively 1.55 mg/mL of APE for each sample. The medium was moderately stirred with a roller type agitator at ambient temperature during 3 months. Samples were collected for analysis at different times; agitation was stopped and sedimentation of microparticles was done by centrifugation (2000 *g*, 2 min) for experiments using only microparticles. 200 μL of supernatant was withdrawn, filtered through a 0.45 μm membrane filter and analyzed by GC using the previously mentioned method. The volume removed was replaced with fresh water dissolution medium. Experiments were stopped after 95 days: medium was filtered and microparticles or functionalized packaging were analyzed by GC. The initial amount of antimicrobial agent was recovered with an experimental error of 1% maximum by calculating the sum of PEA release and remaining in the microparticles at the end of the experiments.

Results and discussion

The aim of this study was to obtain a uniform film containing microparticles loaded with antimicrobial agent able to diffuse for a long time in order to ensure the product protection. In a first time, PMMA microparticles were prepared and characterized. Then, polyurethane films containing microparticles were deposited and the parameters controlling the coating were studied including the viscosity of the dipping suspension and the withdrawal speed. Finally, release studies enabled the comparison between the behavior of microparticles and various films.

Microparticles realization and characterization

The microencapsulation process by solvent evaporation resulted in PMMA microparticles characterized by a mean diameter $d(50) = 97 \pm 7 \mu\text{m}$, with extreme values $d(10) = 55 \pm 3 \mu\text{m}$

and $d(90) = 199 \pm 11 \mu\text{m}$. The PEA loading was 9.37%. The particles were spherical in shape and their surface state was smooth without any defect (Figure 1).

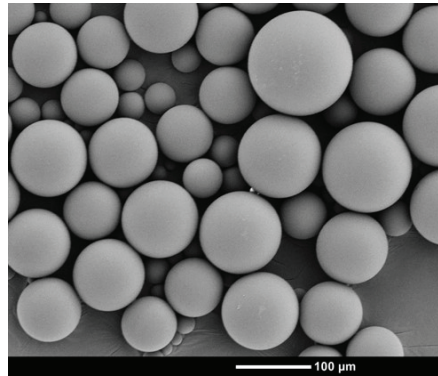


Figure 1. SEM photograph of PMMA microparticles.

Effect of coating parameters on the film properties

The film thickness is the result of the competition among viscous force, capillary force and gravity³⁴. It has been stated that the film thickness was related to the viscosity of the dipping suspension and to the speed at which the substrate plate was withdrawn³⁵. The film thickness increased with increasing withdrawal speed (Figure 2) in accordance with the literature showing that the thickness has a parabolic relationship for high liquid viscosity and substrate withdrawal rate^{36,37,38}:

$$h \propto (\eta U / \rho g)^{1/2} \quad (1)$$

where η is the viscosity (Pa.s); ρ is the density of the dipping suspension (kg.m^{-3}); U is the substrate withdrawal speed (m.s^{-1}), and g is the gravitational acceleration (9.81 m.s^{-2}).

The influence of the viscosity of the dipping suspension was investigated by varying the concentration of thickening agent. It enabled to modify the film thickness in a one pot process. Using only one coating layer is advantageous because it results in a faster process as there is no need to wait for the drying of the layer prior to deposition of a next layer. Moreover, films could be less uniform when several layers are deposited^{39,40}. Tests were done at a withdrawal speed of 0.44 m.s^{-1} and as shown in Figure 3, a parabolic relationship between the film thickness and the dipping solution viscosity has been observed, which was in good agreement with Eq. (2)⁴⁰⁻⁴³.

An increase of the withdrawal rate and viscosity of coating suspensions yielded a film of homogeneous thickness as the error bars lengths representing the standard deviation decreased⁴⁴. Indeed, for a high rate of withdrawal compared to the diffusion coefficient of the microparticles, it is expected that mutually repulsive particles align parallel to the substrate surface³⁶. Moreover thick films took longer time to dry and long drying times allow better particles ordering and alignment³⁶.

The PEA film content increased linearly with the film thickness as illustrated on Figure 4³⁹. Indeed, thicker deposits contained more microparticles than thinner ones. As the coating suspension was composed of 48.5 wt% of microparticles and 48.5 wt% of binder, 9.4 mg of PEA obtained for the maximal withdrawal speed of 0.44 m.s^{-1} was the highest film

content that could be obtained by doing one coating cycle without adding thickening agent. A way to increase the PEA content up to 19.9 mg with a single-layer film would be to deposit thicker films by increasing the dipping suspension viscosity.

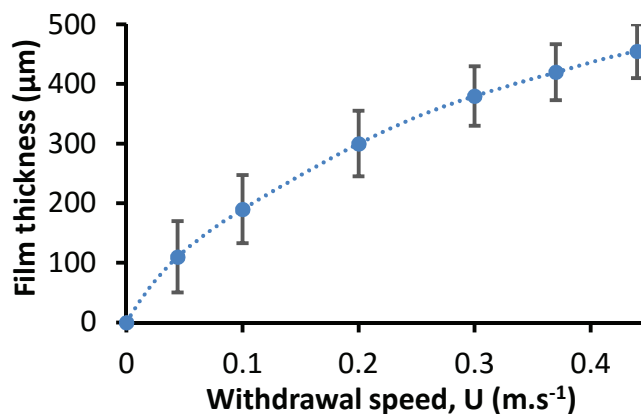


Figure 2. Film thickness as a function of the withdrawal speed in the absence of thickening agent resulting in a viscosity of the coating suspension of 40.1 mPa.s.

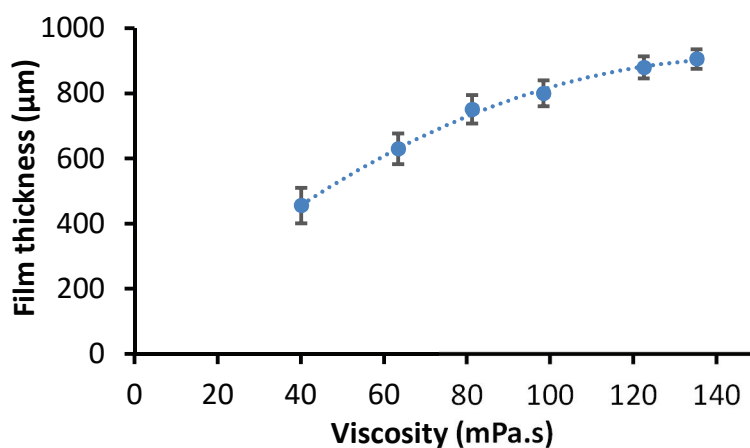


Figure 3. Film thickness as a function of the viscosity of the dipping suspension at a withdrawal speed of 0.44 m.s⁻¹.

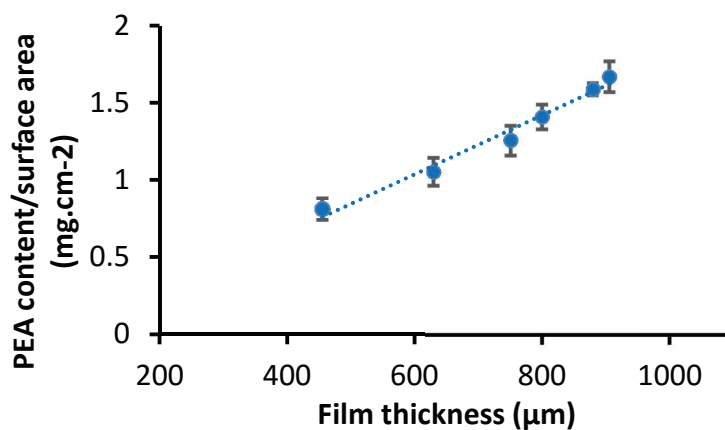


Figure 4. PEA content of the films as a function of their thicknesses.

Microstructure

SEM analysis of the coated substrate (Figure 5) showed smooth films without cracks. Cracks often appear for films below a critical thickness $h_c = 0.5-1 \mu\text{m}$ ^{38,39,45,46}. Moreover, embedded microparticles may alter the internal stresses of the film coating and crack formation may occur⁴⁷. The present smoothness of the films can be explained by the high binder cohesive strength with the substrate that was sufficient to overcome the lateral tensile strength within the film occurring because of drying shrinkage^{38,44,48}. There were microparticles protruding from the coated films although their thicknesses were larger than the diameter of the microparticles. Such phenomenon was particularly pronounced for thin films where few microparticles protruded by more than one radius. For the thicker films, microparticles were engulfed in the binder and protruded much less. The geometrical consequence was a larger area of the coating. Thus, SEM pictures showed that an increase in the viscosity of the coating solution led to microparticles having less contact area with the external medium. This is in good agreement with previous observations claiming that thicker films were more uniform.

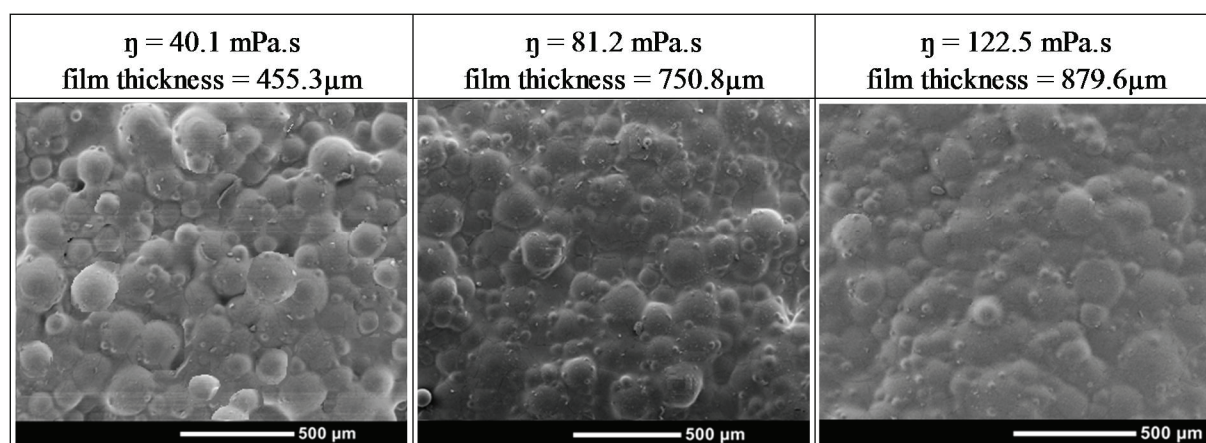


Figure 5. SEM photographs showing polyurethane film containing microparticles loaded with PEA.

Release studies

Release studies of PEA have been performed on 5 different materials: (i) a film in which the active agent was directly dispersed into the polyurethane binder; (ii) three films of different thicknesses containing PEA microspheres; (iii) free loaded PEA microspheres dispersed in water. Characteristics of the films are given in Table 2.

For the different experiments, an initial fast release was observed followed by a slower delivery step (Figure 6). Moreover, it is worth to notice the absence of lag time for coated films that have been observed in previous studies⁴⁹⁻⁵² and the absence of burst release that has also been observed in several instances^{50,53}. It was followed by a slower release stage due to the diffusion of PEA into the dense polymer matrix^{50,54}.

The active agent delivery was faster for free microspheres compared to films containing microparticles, particularly during the rapid release phase; free microspheres released 60 wt% of PEA in 11 days compared to 27 wt% for the thinner film of 455.3 μm (Figure 6). First of all the diffusion of the antimicrobial agent is delayed by the coating because PEA has to diffuse through the PMMA matrix and then through the polyurethane binder⁵⁵. This involved a double

barrier for the active agent diffusion slowing down the release. The effective surface area of the microspheres was also higher (50.80 cm² against 11.86 cm² for the thicker film), which promoted faster materials exchanges with the external medium⁵⁶⁻⁵⁹.

The film of binder containing the dispersed antimicrobial agent without microparticles exhibited a complete release of PEA within 6 days. The delivery was 5.1 times faster than for the thinner film containing microparticles (17.5 wt% in 6 days). Even the free PMMA microparticles released PEA 1.7 times slower than the binder without microparticles (52 wt% in 6 days) although the diffusional path was much shorter and the effective surface area higher. This result proved that the effective surface area was not the governing parameter. Indeed, the polymer matrix permeability plays a key role in the active agent diffusion for non-degradable polymers⁶⁰. As a consequence, the diffusion rate through the polymer matrix may affect the PEA release in some instances and in the present case, the diffusion in the binder material was much faster than in PMMA^{26,49}. As a consequence, the diffusion through the binder was not the release limiting step. The very different nature of the polyurethane binder and PMMA explains this behavior. Indeed, PMMA is a glassy polymer material in which molecular motions are very slow providing a long term release reaching 81.5 wt% in 95 days. On the contrary, the polyurethane binder is made of a soft elastomer that is able to undergo filmification by coalescence as it dries. The diffusion of small organic molecules inside the elastomer is therefore fast.

The delivery of PEA was markedly dependent of the film thicknesses. The total release over 90 days was 71.5 wt% of PEA for the 455.5 µm thickness film, then it decreased to 63.4 wt% for 750.8 µm and finally reached 51.1 wt% for 879.6 µm. Results proved that PEA release was obviously faster for a thinner film due to the shorter diffusional path²⁷. Moreover, SEM photographs have shown that for higher thickness obtained by increasing the dipping solution viscosity the microparticles showed less contact area with the external medium. This result showing that faster PEA delivery is promoted by thinner films and protruding microparticles is in good agreement with the diffusion controlled release mechanism.

Delivery results especially highlighted the importance of the embedded microparticles for obtaining long term sustained release. Indeed, the antimicrobial agent delivery was effective for more than 3 months for every film containing microparticles, whereas it was not the case for films without microparticles. The present results are very satisfactory compared to previous studies^{23,49} because the diffusion rate enabled the product protection along long term storage and use.

The release kinetic data revealed that PEA delivery was controlled by diffusion until 10 days since dependence as the square root of time predicted by the Fick's law was observed. This behavior corresponded to the Higuchi model written as $M(t)/M(\infty) = k_H t^{1/2}$ where k_H is the Higuchi's rate constant. Linear regression to this model for $t < 10$ days resulted in appropriate regression with $r^2 > 0.99$. The exponent 1/2 was confirmed by fitting the Peppas-Korsmeyer equation ($M(t)/M(\infty) = k t^n$) to the same experimental data at short time with respect to k and n , which yielded values of the n exponent ranging between 0.498 and 0.527 for all samples. Diffusion control might take place in several media, either inside the PMMA matrix, or through the binder, or in the stagnant layer at the interface with the aqueous medium. Since the experiment was carried out under stirring and the release kinetics were very slow, it was concluded that the diffusion through the stagnant boundary layer was much faster than the experimental kinetics. Indeed the stagnant layer is thin under stirring and the typical release

time scale is a matter of minutes better than months. As a consequence, the PEA diffusion through the polymeric matrix of PMMA and the polyurethane binder is the main factor affecting the PEA release.

Table 2. Parameters of the films used in release experiments.

Mean film thickness (μm)	Effective surface area (cm ²)	PEA content (mg/cm ²)	Film characteristic
457.8 ± 23.6	11.55	0.81	no microparticles
455.3 ± 55.1	11.55	0.81	microparticles
750.8 ± 45.2	11.77	0.78	microparticles
879.6 ± 32.5	11.86	0.79	microparticles

The release kinetics departed from the $t^{1/2}$ dependence at long times larger than ~10 days, which suggested that a slower diffusion was operating. However the $t^{1/2}$ dependence coming from Fick's law with a constant diffusivity is only an approximation valid at short time, so that was expected that the experimental data deviated from the $t^{1/2}$ dependence. A comparison of the full experimental data with the exact theoretical behavior calculated from the Fick's law for a constant diffusivity and sink release conditions allowed to know whether there actually was a regime of slower diffusion at long times.

The release kinetics for spheres reads⁶¹:

$$\frac{M(t)}{M(\infty)} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} e^{-\frac{Dn^2\pi^2}{R^2}t} \quad (2)$$

where R is the radius of microparticles (m) and D is the diffusivity of PEA inside the PMMA microparticles (m².s⁻¹).

The release kinetics for a homogeneous flat film of thickness L (m) reads⁶²:

$$\frac{M(t)}{M(\infty)} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} e^{-\frac{D(2n+1)^2\pi^2}{4L^2}t} \quad (3)$$

Figure 6 shows the theoretical prediction of the equations fitted to the experimental data at short times using the radius of the microparticles $R = 50 \mu\text{m}$, the thickness of the coatings given in Table 2, and adjusted diffusivities. Indeed the theory predicted a departure from the $t^{1/2}$ dependence; but the experimental departure was larger than calculated, showing that there was indeed a slower diffusion at long times. Such slower diffusion regime started when the released amount was 60% (except for the pure binder), that is, when the remaining amount of PEA inside the PMMA microparticles was lower than 40% of the initial loading. Such behavior suggested that the PEA acted as a plasticizer of PMMA at short times where its concentration was rather high, and that PMMA hardened as the concentration of PEA plasticizer decreased. In other words, the diffusivity of PEA in PMMA was not constant throughout the whole release process. The diffusivities inferred from the diffusion models were $D = 1.6 \times 10^{-16} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ for the free microparticles, $D = 3.3 \times 10^{-13} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ for the film of pure binder, and $D = 1.8 \times 10^{-14} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$,

$D = 2.8 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $D = 2.0 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for the films containing microparticles with a thickness of 455.3 μm , 750.8 μm and 879.6 μm respectively. The diffusivity in the binder was much faster than in PMMA. Indeed, PMMA is a glassy material where the diffusion is very slow, whereas the polyurethane binder is made of a film-forming polymer in its rubbery state where the diffusion of solutes is fast. The diffusivities of the films containing microparticles were of the same order of magnitude; the slower release from thick films was the geometrical consequence of the larger thickness. Finally, it should be noticed that the diffusivity in films was an effective diffusivity since the films were not homogeneous media combining microparticles where the diffusion was very slow and the binder where the diffusion was fast.

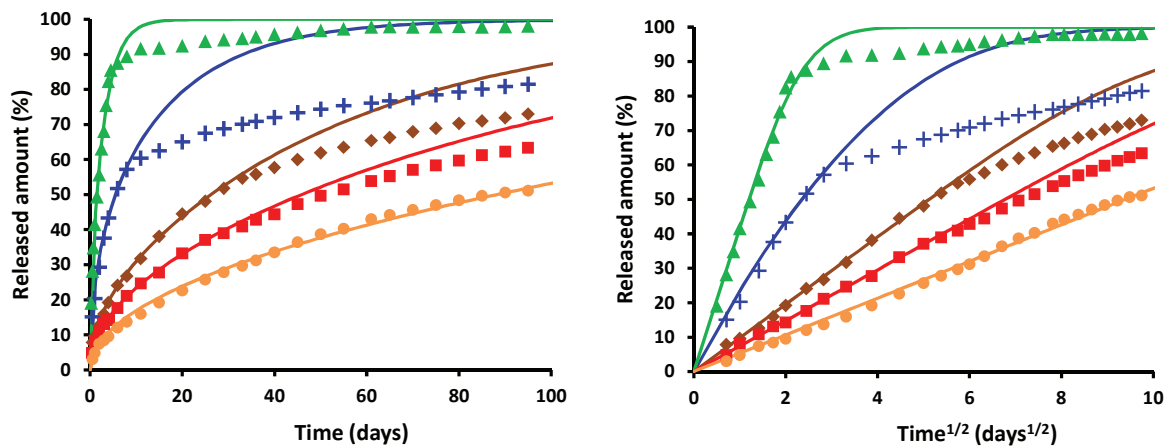


Figure 6. Cumulative PEA release kinetics depending on the formulation. Left: Released amount as a function of time, t . Right: Released amount as a function of $t^{1/2}$. Green triangles: pure polyurethane binder; blue crosses: free PMMA microparticles in aqueous suspension; brown diamonds: film of 455.3 μm thickness; red squares: film of 750.8 μm thickness; orange circles: film of 879.6 μm thickness. Solid lines are the theoretical best fits to the short time data.

Conclusion

This study has highlighted the benefits of the dip-coating process that allows the modulation of the release rate according to the needs by adjusting several independent parameters: the withdrawal speed rate, the viscosity of the dipping solution, the encapsulation mode of the active agent. Results suggested that long term sustained delivery can be achieved thanks to microencapsulation strategy. A sustained release over several months could be achieved by selecting a glassy polymer as an encapsulation material. The release rate of the antimicrobial agent from films was mainly controlled by its diffusion in the microparticles in such a case. As an outcome, packagings coated with microparticles provide an interesting solution for obtaining long term sustained release of antimicrobial agent lasting longer than 3 months compared to 6 days without microparticles.

Acknowledgments

This work was done thanks to the financial support from the Fond Unique Interministériel under the project FUI STABIPACK.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

References

1. Brannan DK. Cosmetic preservation. *J Soc Cosmet Chem* 1995;46:199–200.
2. Brul S, Coote P. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol* 1999;50:1–17.
3. Bean HS. Preservatives for pharmaceuticals. *J Soc Cosmet Chem* 1972;23:703–720.
4. Perrenoud D, Bircher A, Hunziker T, Suter H, Bruckner-Tuderman L, Stäger J, Thürlimann W, Schmid P, Suard A, Hunziker N. Frequency of sensitization to 13 common preservatives in Switzerland. *Contact Dermatitis* 1994;30:276–279.
5. Hong J, Bielory L. Allergy to ophthalmic preservatives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:447–453.
6. Bleasel N, Tate B, Rademaker M. Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. *Australas J Dermatol* 2002;43:211–213.
7. Goossens A, Beck MH, Haneke E, McFadden JP, Nolting S, Durupt G, Ries G. Adverse cutaneous reactions to cosmetic allergens. *Contact Dermatitis* 1999;40:112–113.
8. Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, Protopapa E, Kintziou H, Kefala V, Demetzos C. Self-preserving cosmetics. *Int J Cosmet Sci* 2009;31:163–175.
9. Lucchini JJ, Corre J, Cremieux A. Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols. *Res Microbiol* 1990;141:499–510.
10. Corre J, Lucchini JJ, Mercier GM, Cremieux A. Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Res Microbiol* 1990;141:483–497.
11. Silver S, Wendt L. Mechanism of action of phenylethyl alcohol: breakdown of the cellular permeability barrier. *J Bacteriol* 1967;93:560–566.
12. Han JH. Antimicrobial food packaging. *Food Technol* 2000;54:56–65.
13. Ahvenainen R, Hurme E. Active and smart packaging for meeting consumer demands for quality and safety. *Food Addit Contam* 1997;14:753–763.

14. Vermeiren L, Devlieghere F, Debevere J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Addit Contam* 2002;19:163–171.
15. Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2002;3:113–126.
16. Scriven LE. Physics and applications of dip coating and spin coating. *Mater Res Soc Symp Proc* 1988;121:717–729.
17. Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J Food Sci* 2003;68:408–420.
18. Han JH, Floros JD. Modeling antimicrobial activity loss of potassium sorbate against Baker's yeast after heat process to develop antimicrobial food packaging materials. *Food Sci Biotechnol* 1999;8:11–14.
19. Appendini P, Hotchkiss J. Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. *Packag Technol Sci* 1997;10:271–279.
20. Choi JH, Choi WY, Cha DS, Chinnan MJ, Park HJ, Lee DS, Park JM. Diffusivity of potassium sorbate in K-carrageenan based antimicrobial film. *LWT–Food Sci Technol* 2005;38:417–423.
21. Danese PN. Antibiofilm approaches: prevention of catheter colonization. *Chem Biol* 2002;9:873–880.
22. Li Z, Lee D, Sheng X, Cohen RE, Rubner MF. Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities. *Langmuir* 2006;22:9820–9823.
23. Ofori-Kwakye K, Fell JT. Biphasic drug release from film-coated tablets. *Int J Pharm* 2003;250:431–440.
24. Marvola M, Nykanen P, Rautio S, Isonen N, Autere A. Enteric polymers as binders and coating materials in multiple-unit site-specific drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 1999;7:259–267.
25. Guiga W, Galland S, Peyrol E, Degraeve P, Carnet-Pantiez A, Sebti I. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2009;10:203–207.
26. An DS, Kim Y M, Lee SB, Paik HD, Lee DS. Antimicrobial low density polyethylene film coated with bacteriocins in binder medium. *Food Sci Biotechnol* 2000;9:14–20.
27. Sayanjali S, Ghanbarzadeh B, Ghiassifar S. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on

some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. LWT–Food Sci Technol 2011;44:1133–1138.

28. Möller H, Grelier S, Pardon P, Coma V. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films. J Agric Food Chem 2004;52:6585–6591.

29. Lee CH, An DS, Park HJ, Lee DS. Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. Packag Technol Sci 2003;16:99–106.

30. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. Int J Pharm 2008;363:26–39.

31. Chanda M, Roy SK. Plastics Technology Handbook. CRC press 2006;72.

32. Dash AK. Determination of the physical state of drug in microcapsule and microsphere formulations. J Microencapsul 1997;14:101–112.

33. Kim BK, Hwang SJ, Park JB, Park HJ. Preparation and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. J Microencapsul 2002;19:811–822.

34. Keary CM, Heeschen WA. Wet film dimensions of capsule walls during dip coating. Drug Dev Ind Pharm 2002;28:1059–1076.

35. Dislich H, Hussmann E. Amorphous and crystalline dip-coatings obtained from organo-metallic solutions: Procedures, chemical processes and products. Thin Solid Films 1969;77:129–133.

36. Brinker CJ, Frye GC, Hurd AJ, Ashley CS. Fundamentals of sol-gel dip-coating. Thin Solid Films 1991;201:97–108.

37. Gugliemi M, Colombo P, Peron F, Mancinelli Degli Espoti L. Dependence of thickness on the withdrawal speed for SiO₂ and TiO₂ coatings obtained by dipping method. J Mater Sci 1992;27:5052–5056.

38. Grosso D. How to exploit the full potential of the dip-coating process to better control film formation. J Mater Chem 2011;21:17033–17036.

39. Radin S, Ducheyne P. Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on titanium alloy fracture plate material. Biomaterials 2007;28:1721–1729.

40. Sonawane RS, Kale BB, Dongare MK. Preparation and photo-catalytic activity of Fe-TiO₂ thin films prepared by sol–gel dip coating. Mater Chem Phys 2004;85:52–57.

41. Strawbridge I, James PF. The factors affecting the thickness of sol gel derived silica coatings prepared by dipping. *J Non-Cryst Solids* 1986;86:381–393.
42. Strawbridge I, James PF. Thin silica films prepared by dip coating. *J Non-Cryst Solids* 1986;82:366–372.
43. Negishi N, Takeuchi K. Preparation of TiO₂ thin film photocatalysis by dip-coating using a highly viscous solvent. *J Sol-Gel Sci Technol* 2001;22:23–31.
44. Baqué L, Serquis A. Microstructural characterization of La_{0.4}Sr_{0.6}Co_{0.8}Fe_{0.2}O_{3-δ} films deposited by dip coating. *Appl Surf Sci* 2007;254:213–218.
45. Brinker CJ, Hurd AJ, Frye GC, Ward KJ, Ashley CS. Sol-gel thin film formation. *J Non-Cryst Solids* 1990;121:294-302.
46. Lii DF, Huang JL, Tsui LJ, Lee SM. Formation of BN films on carbon fibers by dip-coating. *Surf Coat Technol* 2002;150:269–276.
47. Felton LA, McGinity JW. Influence of insoluble excipients on film coating systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2002;28:225–243.
48. Porter SC, Felton LA. Techniques to assess film coatings and evaluate film-coated products. *Drug Dev Ind Pharm* 2010;36:128–142.
49. Ho L, Cuppok Y, Muschert S, Gordon KC, Pepper M, Shen Y, Siepmann F, Siepmann J, Taday PF, Rades T. Effects of film coating thickness and drug layer uniformity on *in vitro* drug release from sustained-release coated pellets: A case study using terahertz pulsed imaging. *Int J Pharm* 2009;382:151–159.
50. RamaRao P, Diwan PV. Formulation and in vitro evaluation of polymeric films of diltiazem HCl and indomethacin for transdermal administration. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:327–336.
51. Swain S, Behera UA, Beg S, Sruti J, Patro CN, Dinda SC, Rao MEB. Design and characterization of enteric-coated controlled release mucoadhesive microcapsules of Rabeprazole sodium. *Drug Dev Ind Pharm* 2013;39:548–560.
52. Mohamed FA, Roberts M, Seton L, Ford JL, Levina M, Rajabi-Siahboomi AR. Film-coated matrix mini-tablets for the extended release of a water-soluble drug. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;41:623–630.
53. Yan C, Resau JH, Hewetson J, West M, Rill WL, Kende M. Characterization and morphological analysis of protein loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. *J Control Release* 1994;32:231–241.

54. Spenlehauer G, Vert M, Benoit JP, Chabot F, Veillard M. Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: morphology and release characteristics. *J Control Release* 1988;7:217–229.
55. Spizzirri UG, Cirillo G, Curcio M, Spataro T, Picci N, Iemma F. Coated biodegradable casein nanospheres: a valuable tool for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;29:1–12.
56. Roy S, Pal M, Gupta BK. Indomethacin-loaded microspheres: design and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation. *Pharm Res* 1992;9:1132–1136.
57. Gautier H, Guicheux J, Grimandi G, Faivre A, Daculsi G, Merle C. In vitro influence of apatite-granule-specific area on human growth hormone loading and release. *J Biomed Mater Res* 1998;40:606–613.
58. Das SK, Das NG. Preparation and in vitro dissolution profile of dual polymer (Eudragit™ RS100 and RL100) microparticles of diltiazem hydrochloride. *J Microencapsul* 1998;15:445–452.
59. Ragnarsson G, Johansson MO. Coated drug cores in multiple unit preparations: influence of particle size. *Drug Dev Ind Pharm* 1988;14:2285–2297.
60. Siepmann F, Muschert S, Leclercq B, Carlin B, Siepmann J. How to improve the storage stability of aqueous polymeric film coatings. *J Control Release* 2008;126:26–33.
61. Siepmann J, Ainaoui A, Vergnaud JM, Bodmeier R. Calculation of the dimensions of drug-polymer devices based on diffusion parameters. *J Pharm Sci* 1998;87:827–832.
62. Vergnaud JM. Controlled Drug release of Oral Dosage Forms. London: Ellis Horwood, 1993.

Résumé des résultats principaux

Cette étude a mis au point un procédé d'enduction de films minces contenant des microparticules d'agents antimicrobien à la surface de conditionnements primaires polyoléfines. Il a été mesuré l'impact de différentes épaisseurs de couche déposées ainsi que de l'état de dispersion de l'agent antimicrobien.

- *Réalisation et caractérisation des films antimicrobiens*

Concernant les paramètres du procédé de revêtement par immersion, il a été déterminé que l'épaisseur du film déposé augmente avec la viscosité de la dispersion liante et la vitesse de retrait de la plaque polyoléfine. Les films déposés sont homogènes et lisses, sans fissure apparente. Les couches réalisées démontrent des microparticules proéminentes notamment pour des films fins et ce bien que le diamètre des particules soit inférieur à l'épaisseur du film déposé (97 μm contre 455,3 μm respectivement).

- *Etude des cinétiques de libération*

Les mesures de cinétiques de libération ont démontré que la libération de l'alcool phényléthylrique est plus rapide pour des films fins (en 3 mois : 71,5 % libéré pour un film d'épaisseur de 455,3 μm contre 51,5% libéré pour un film d'épaisseur de 879,6 μm). En effet, les films fins contiennent davantage de particules proéminentes et sont caractérisés par une distance diffusionnelle pour atteindre le milieu extérieur qui est plus faible.

La comparaison entre la cinétique de libération pour des films contenant l'agent antimicrobien non encapsulé et encapsulé démontre la valeur ajoutée de l'introduction de microparticules au sein des films. En effet, quel que soit l'épaisseur ($> 455,3 \mu\text{m}$) les films contenant les microparticules d'alcool phényléthylrique sont caractérisés par une libération prolongée sur plus de 3 mois contrairement à 6 jours obtenus pour des films contenant l'agent antimicrobien non encapsulé.

Etude expérimentale

Chapitre III:

*Etude du partage de l'alcool phényléthylique
au sein d'une émulsion et mesure de l'activité
antimicrobienne résultante*

Introduction

La littérature démontre que la fraction disponible en agent antimicrobien est la concentration libre présente en solution aqueuse [Bean et al., 1965 ; Kazmi et mitchell, 1978]. Or dans le cas de systèmes complexes tels que les émulsions un partage de l'agent antimicrobien se produit au travers des différentes phases que sont l'eau, l'huile et les micelles [Bean et al., 1965]. Ainsi, la fraction aqueuse libre disponible en conservateur diminue ce qui impacte la préservation de la formulation.

L'objectif de ce projet est de réduire la concentration en alcool phényléthylique à la quantité minimale nécessaire pour assurer la conservation de la formule. Pour ce faire, il est nécessaire de comprendre et quantifier les partages que subit l'agent antimicrobien au sein des différentes phases de l'émulsion. Ainsi, il sera possible d'estimer la fraction d'alcool phényléthylique libre disponible en phase aqueuse et donc microbiologiquement active, en fonction des constituants de la formule.

Afin de répondre à la problématique posée, il a été mesuré les coefficients de partage de l'alcool phényléthylique micelles/eau et huile/eau. Les constituants sélectionnés sont des composés usuellement utilisés dans les formulations cosmétiques à savoir le polysorbate 80 ainsi qu'une huile triglycéride à chaînes moyennes. L'étude de ces deux modèles aqueux et micellaires a permis de développer un modèle mathématique permettant de calculer la fraction libre en agent antimicrobien présent au sein de la phase aqueuse d'une émulsion. Les calculs réalisés à partir de ce modèle mathématique ont été comparés avec les résultats du dosage des différentes phases de l'émulsion. L'apport de ce travail par rapport aux études existantes résulte en la réalisation d'essais d'efficacité microbiologique avec les cinq souches du challenge test effectués pendant 14 jours afin de corréler le modèle mathématique à des mesures quantitatives. En effet, la majorité des travaux dans ce domaine ne réalise pas de mesures microbiologiques permettant de discuter la validité du modèle mathématiques présenté [Shimamoto et Mima, 1979; Watrobska-Swietlikowska et Sznitowska, 2006; Han et Washington, 2005].

Ce travail est présenté sous forme de publication. Sa soumission est prévue dans *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.

Références

- [Bean et al., 1965] Bean H.S., Heman-Ackah S.M., Thomas J., 1965. The activity of antibacterials in two-phase systems. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 16, 15–30.
- [Han et Washington, 2005] Han J., Washington C., 2005. Partition of antimicrobial additives in an intravenous emulsion and their effect on emulsion physical stability. *Int. J. Pharm.*, 288, 263–271.
- [Kazmi et Mitchell, 1978] Kazmi S.J.A., Mitchell A.G., 1978. Preservation of solubilized and emulsified systems I: Correlation of mathematically predicted preservative availability with antimicrobial activity, *J. Pharm. Sci.*, 67, 1260–1266.
- [Shimamoto et Mima, 1979] Shimamoto T., Mima H., 1979. A model for the evaluation and prediction of preservative activity in oil-in-water emulsions, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 2743–2750.
- [Watrobska-Swietlikowska et Sznitowska, 2006] Watrobska-Swietlikowska D., Sznitowska M., 2006. Partitioning of parabens between phases of submicron emulsions stabilized with egg lecithin. *Int. J. Pharm.*, 312, 174–178.

Study of the phenylethyl alcohol partition in an emulsion and resulting antimicrobial efficiency

Jessica Bile^a, Marie-Alexandrine Bolzinger^a, Fenet Bernard^b, Hatem Fessi^a, Yves Chevalier^a

^a *Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), CNRS UMR 5007, CPE, 43 bd du 11 novembre, 691000 Villeurbanne, France*

^b *Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Commun de RMN, CPE-Lyon, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622, Villeurbanne Cedex, France*

Abstract

The activity of an antimicrobial agent has been proved to be controlled by the free preservative fraction present in the aqueous phase. In complex systems like emulsions the preservative is partitioned between several phases: the water, the oil and the micellar phase. Thus the microbiological activity is reduced compared to aqueous solutions and the ability of the preservative to prevent microbiological growth may be inhibited if insufficient concentrations are used. In this study, a simple mathematical model was proposed to predict the distribution and related antimicrobial activity of phenylethyl alcohol (PEA) in emulsified systems stabilized by nonionic surfactants as polysorbate 80. The model used the PEA micelles/water partition coefficient and oil/water partition coefficient leading to the calculation of the amount of free PEA in the water of the emulsion. Theoretical predictions were compared with emulsion experimental dosage measurements resulting in adequate correlations. Moreover, results from the mathematical model were in good agreement with those obtained from the microbiological assays using the five microorganisms of the challenge test during 14 days. This study led to the conclusion that amount of required PEA to ensure microbiological protection is respectively 1.6 and 4.3 times higher for a micellar solution and an emulsified system compared to a simple aqueous solution. It proved that biological activity of an antimicrobial agent is highly dependent on the formulation composition and that simple mathematical model achieved to predict the total preservative concentration that needed to be introduced for microbiological preservation.

Keywords: preservative distribution; oil-in-water emulsion; antimicrobial activity; mathematical model; micelles/water partition coefficient; oil/water partition coefficient

1. Introduction

Antimicrobial agents are used as preservatives to protect the product from contaminations by microorganisms, thereby extending its shelf-life and protecting the consumer from potential infections. Preservatives are currently used in several fields and particularly in pharmaceuticals and cosmetics formulations (Brannan, 1995; Brul and Coote, 1999). Recent study of Darbre et al., 2004 demonstrating the possible accumulation of parabens in breast cancer have raised the attention on preservatives. Moreover, it has been proved that several preservatives of chemical and natural origins as essential oils may cause allergies or contact sensitizations (Perrenoud et al., 1994; Hong and Bielory, 2009; Bleasel et al., 2002). In this polemical context, an alternative is to use excipients that have an antimicrobial activity but that are not registered as preservatives. The phenylethyl alcohol (PEA) meets these criteria because

by being the major component of the rose it is usually added in formulations as perfume but it has been proved to bring about a bacteriostatic effect (Lilley and Brewer, 1953). Indeed, PEA causes a rapid and irreversible breakdown in the permeability barriers of bacterial cells especially for Gram-negative species in a large variety of formulations such as aqueous systems and oil-in-water (O/W) emulsions (Silver and Wendt, 1967). Using a non-registered preservative is not satisfactory enough and the growing suspicion of consumers regarding the safety of antimicrobial agents drives the research which is now focused on the development of formulations containing low amount of preservatives, meaning the minimum efficient concentration (Vermeiren et al., 2002). In order to meet this requirement, understanding of the antimicrobial activity in formulations has to be mastered.

The efficiency of an antimicrobial agent is determined by its aqueous concentration as the growth of microorganisms occurs in the aqueous phase (Bean et al., 1965 ; Kazmi et mitchell, 1978). Numerous factors control the availability of the preservative in the aqueous phase, especially in heterogeneous systems. Attention has to be paid to biphasic systems, as oil in water dispersions, in which the oil/water partition coefficient governed the distribution of the preservative in the water phase (Bean et al., 1965). In micellar systems composed of water and surfactant, fractions of preservative may be solubilized within the micelles. It has been proved that only the fraction of free antimicrobial is available for microbiological preservation whereas the preservative solubilized in micelles is devoid of antimicrobial activity (Mukerjee, 1971). The topic is even more complex in emulsion systems in which the preservative partitions into the oil and micellar phase leading to a decrease in preservation activity. In particular, Han and Washington, 2005 has proved that the concentration of methylparaben required to be microbiologically active is four to five times higher in the case of an emulsion compared to an aqueous phase.

Mathematical models have been intensively developed between 1960 and 1970 to predict the necessary preservative concentration in a surfactant solution or in an emulsion based on the fact that only the free preservative molecules are microbiologically actives (Bean et al., 1965; Bean et al., 1969; Garrett, 1966; Patel and Romanowski, 1970; Kazmi and Mitchell, 1971). This is related to increasing number of failure to protect water-in-oil formulations from microbial spoilage observed in these times. Indeed, this period was characterized by surfactants changes from anionic to nonionic and the reformulation modified the resistance of the product to microbial attack (Bean et al., 1965). After 1970, and to the best of our knowledge, very few studies have been focused on this subject despite of the growing interest resulting from the nowadays polemical context. Concerning the mathematical equations that have been established by previous works, correlation of theoretical datas with the measured antimicrobial activity using normed tests have rarely been established. Some of the fundamentals works on this fields as Kazmi and Mitchell, 1978 realized viable counts of *E. coli* using the membrane filtration technique during 8 hours and Patel and Romanowski, 1970 studied the growth of *A. niger* for a 2 week period in the form of visible mycelial hyphae. Other works don't even use microbiological assay to correlate the theoretical and experimental datas with antimicrobial activity (Shimamoto and Mima, 1979; Watrobska-Swietlikowska and Sznitowska, 2006; Han and Washington, 2005).

The objective of this study is to realize a mathematical model for predicting the preservative concentration in the different phases of complex systems as O/W emulsions. This model is built on the measurement of antimicrobial agent partitions in simple micellar and biphasic systems. The analysis technique used to measure the micelles/water partition

coefficient is the NMR DOSY which is different from the widely used dialysis methods, centrifugation or filtration (Kazmi and Mitchell, 1971; Shimamoto et al., 1973; Patel and Romanowski, 1970; Garrett, 1966). This work provides qualitative datas about antimicrobial efficiency by using microbiological assays during 14 days with the five microorganisms of the challenge test. To ensure the validity of the mathematical model, correlation with physico-chemical and microbiological evaluations have been realized.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Polysorbate 80 (T80) and phosphate buffered saline (PBS) resulting in a formulation at $\text{pH} = 7.4 \pm 0.11$ were from Fisher Scientific. Phenylethyl alcohol (PEA) was obtained from SFA. Triglycerides containing medium chains of saturated fatty acids (TMC) with 35-45% of C10 and 50-65% of C8 was purchased from Stearinerie Dubois with the commercial name triglycerides C8C10 55/45.

2.2 Partition coefficient measurements

2.2.1 Oil/water partition coefficient

The oil/water partition coefficient was measured for different PEA concentrations at $25^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$. Indeed, the OECD guideline for the testing of chemicals concerning the oil/water partition coefficient using the shake flask method recommended that the solute concentration in either phase should be below 0.01 mol/L. Three experiments were carried out, one following the guideline considerations with a PEA total concentration of 0.07 wt%, and the others at 0.25 wt% and 4 wt%.

The APE partition between the aqueous phosphate buffered saline and the TMC phases was measured by introducing 0.07 wt%; 0.25 wt% and 4 wt% of APE in 8.4 mL of water and 3.6 mL of TMC previously saturated with each other. The mixture was stirred magnetically for 5 h at ambient temperature and the phases were separated by centrifugation (Centrifuge 5430, Eppendorf, Germany) for 20 min at 5,000 rpm which corresponded to a relative centrifugal force of 2,935 *g* in order to break the emulsion. Each phase was collected and analyzed for the APE content by high-pressure liquid chromatography (HPLC) with a reverse phase column. The HPLC set up from Agilent (France) was composed of a Agilent 717 injector, an Agilent pump, a reverse phase column X-Terra MS C18 column (3.5 μm , 3.9^x 100 mm) and a photodiode array UV detector working at 257 nm. The elution with water/acetonitrile/methanol/tetrahydrofurane (65/20/10/5) solvent at 2.1 mL.min⁻¹ flow rate and 30°C gave a retention time of 1.7 min for APE. The calibration curve for quantitative analysis was linear up from 10 to 400 $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($r^2 = 0.999$). Dilution solvent for samples was composed of ethanol/water/H₂SO 4N (88.2:9.8:2).

2.2.2 Micelle/water partition coefficient

Quantitative measurement of the phenylethyl alcohol solubilization in the polysorbate 80 micelles were obtained using the NMR DOSY technique. Several formulation were tested from 0.01mM to 200mM of T80 corresponding to 0.01 wt% to 24 wt%. The concentration of PEA was fixed at 0.25 wt%.

NMR spectra were recorded on BRUKER AVANCE III spectrometer operating at 500.13MHz for ^1H . D_2O where used for locking. The sample temperature was controlled within ± 0.1 K by a variable temperature control unit BVT3200 using a nitrogen gas flow (527 L.h^{-1}), and the temperature where calibrated with a BRUKER MeOD 4% temperature calibration tube. The concentration where check by NMR with the BRUKER ERETIC2 method. Prior acquiring spectra, tuning probe and 90° pulse calibration where done.

The pulsed-field gradient spin-echo NMR technique for DOSY used the standard BRUKER ledbpgp2s pulse program, 40 gradients values spread on a quadratic scale generated by a homemade AU program to get good sampling for short and long diffusion values (more points for small gradients than for great ones), a repetition time set to 4.82s, trapezoidal gradients to maximize gradient strength with $p30=\delta/2=6\text{ms}$, $\Delta=d20=100\text{ms}$, 32 scans, and 8 dummy scans. Self-diffusion coefficients where extracted with the BRUKER T1/T2 module.

Measurement of the diffusion coefficient enable the calculation of the preservative fraction in the micelles (Stilbs, 1983):

$$x_{mic}^s = \frac{D_{meas}^s - D_{free}^s}{D_{mic}^s - D_{free}^s}$$

with: D_{meas}^s = diffusion coefficient of the preservative in the micellar solution (cm^2/s); D_{free}^s = diffusion coefficient of the preservative in pure water without surfactant (cm^2/s); D_{mic}^s = micellar self-diffusion coefficient itself (cm^2/s)

Results of the surfactant diffusion coefficient also led to the calculation of the micelles mean hydrodynamic radius using a formula analogous to the Stokes-Einstein relation for spherical particles (Mazer et al., 1976):

$$D_{mic}^s = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

where: k is the Boltzmann's constant (J.K^{-1}), T is the absolute temperature (K), and η is the coefficient of viscosity in the solvent (cm^3/g).

2.3 Formulations preparation

Three types of formulations were prepared: an aqueous solution, a micellar solution and a O/W emulsion. For the aqueous solution, PEA was mixed with a magnetic stirrer in the aqueous phase containing the PBS at $\text{pH} = 7.4 \pm 0.11$. Concerning the micellar solution, polysorbate 80 is added to the previous described preparation that is mildly stirred until complete solubilization. For the emulsion the TMC was added at 30 wt% to the aqueous phase containing PBS, polysorbate 80 at 3 wt% and various concentrations of PEA (Table 1). The emulsification was done thanks to an IKA rotor stator (S 25 N 18 G ST) at the speed rate of 9,800 rpm during ten minutes. The mean droplets size was $7.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$.

Table 1. Abbreviations and formulation composition of water based sample tested for microbiological protection.

Abbreviation	Formulation composition
<i>Aq 0.25</i>	PEA 0.25%
<i>Mic 0.25</i>	PEA 0.25% T80 3%
<i>Mic 0.39</i>	PEA 0.39% T80 3%
<i>Em 0.25</i>	PEA 0.25% T80 3% TCM 30%
<i>Em 1.0</i>	PEA 1.0% T80 3% TCM 30%

2.4 Emulsion dosage

The PEA fractions present in the different phases of the emulsion containing 30% of TCM, 3% of T80 and 0.25% of PEA (*Em 0.25*) were determined by HPLC with the previously mentioned method. First, PEA content of the entire emulsion was measured. Then, in order to determine the PEA concentration present in the aqueous phase containing micelles, the emulsion was centrifuged (Centrifuge 5430, Eppendorf, Germany) at 7,000 rpm corresponding to 5,752 g for 35 min to cream the oil droplets without demixion or sedimentation of the micellar phase. Particle size measurements led to the same mean diameter of droplets before and after centrifugation showing that it didn't destabilize the O/W emulsion resulting in conservation of the surface area and thus of the preservative distribution. The aqueous phase obtained by normal centrifugation was opalescent because of the micellar phase of T80. Ultracentrifugation (Optima MAX-XP, Beckman Coulter, USA) of this micellar aqueous phase at 50,000 rpm corresponding to 339 666 g for 1h was realized to sediment the micelles and clear the aqueous subnatant that was analyzed to determine the amount of free APE contained in the water phase. The fraction of PEA solubilized in the micelles was obtained by subtracting the preservation concentration in the aqueous phase containing T80 micelles with the free amount present in the water.

2.5 Microbiological assays

For the microbiological assays, formulations containing PBS buffer was tested by Cosmepar (France). The BioLumix Optical Technology was used: it is a rapid biological method that detects the presence of specific organisms and provide an estimation of vial cell count (Miller, 2012). It is based on continuously monitoring changes of color as a result of the microbial metabolism in the tested vials. The method uses the USP <51> microorganisms: *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Aspergillus niger* ATCC 16404. The technology provides simultaneous detection of changes in either color, fluorescence and CO₂ content as a result of microbial growth and metabolism. For yeasts, molds and *pseudomonas aeruginosa*: the tested vial contained a CO₂ sensor at the bottom of the vial and had selective medium for the detection of the selected micro-organism. For the *escherichia coli* micro-organism, the vial contained a membrane filter to separate the incubation zone where the media, sample and microorganism were present, from the measuring zone in the bottom of the vial where the

detector reads the results. The escherichia coli assay is based upon the detection of the microbial cleavage of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide using the fluorescence sensor. Concerning the staphylococcus aureus, vials contained a membrane filter and a selective and differential growth medium above containing mannitol and the pH indicator (phenol red). Growth of staphylococcus aureus resulted in a color change from red to yellow.

The formulations were inoculated with a concentration between 10^4 and 10^6 CFU.g⁻¹ (Colony Forming Units per gram of product). Incubation of the products was realized at 25°C. At predefined time intervals of 7 and 14 days, analysis were done to measure the amount of survival microorganisms. The results were expressed in terms of A and B criteria from the standard NF EN ISO 11930 that defined the log₁₀ microorganisms concentrations decrease in the sample (Table 2). The A criterion represents the target ensuring the full microbial protection of the product. The B criterion is acceptable if the A criterion cannot be fulfilled for strong reasons.

Table 2. Evaluation criteria of the antimicrobial efficiency described in the NF EN ISO 11930. NI: no increase compared to the previous analysis. Results are expressed as the logarithm of decrease of the tested microorganism.

Microbial strain	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Candida albicans</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	
	T7	T14	T7	T14	T7	T14	T7	T14	T7	T14
A criterion	≥ 3 log	NI	≥ 3 log	NI	≥ 3 log	NI	≥ 1 log	NI	NI	NI
B criterion	Optional	≥ 3 log	Optional	≥ 3 log	Optional	≥ 3 log	Optional	≥ 1 log	NI	NI

3. Results and discussion

3.1 Theoretical study

In a biphasic system containing oil and water, the preservative partitioned between the two phases according to the following equation (Bean et al., 1969):

$$C_w = \frac{C(\phi+1)}{K_{o/w}\phi+1} \quad (1)$$

with: C_w = preservative concentration in the water phase (mol/m³); C = total concentration of preservative (mol/m³); ϕ = oil/water ratio; $K_{o/w}$ = oil/water partition coefficient

For a micellar solution, surfactant fractions above the critical micellar concentration form micelles in solution which behaves as an additional phase that can solubilized part of the preservative. Indeed, aqueous micellar solutions have the ability to solubilize a wide range of organic solutes with various polarities and degrees of hydrophobicity (Fatemi and Karimian, 2007). As a consequence the micellar/water partition coefficient needs to be taken into account:

$$K_{mic/w} = \frac{C_{mic}}{C_w} = \frac{n_{mic}^s}{V_{mic} + V_{mic}^s} \times \frac{V_w + V_w^s}{n_w^s} = \frac{x_{mic}^s}{1 - x_{mic}^s} \times \frac{V_w + V_w^s}{V_{mic} + V_{mic}^s} \quad (2)$$

with: $K_{mic/w}$ = micelle/water partition coefficient; C_{mic} = preservative concentration in the micellar phase (mol/m^3); n_{mic}^s : mole number of the preservative present in the micellar phase (mol); V_{mic} : volume of micellar phase (m^3); V_{mic}^s : volume of preservative present in the micellar phase (m^3); V_w : volume of water (m^3); V_w^s : preservative volume present in the water phase (m^3); n_w^s : mole number of the preservative in the water phase (mol); x_{mic}^s : molar fraction of preservative present in the micellar phase

For systems as emulsions, surfactant are added in order to stabilize the interface of oil droplets dispersed in a water phase. As a consequence, preservatives added into an emulsion partitioned between the three phases according to the oil/water and micelles/water partition coefficients. Thus the fraction of free preservative in the water phase of an emulsion (x_w^s) may be calculated by:

$$x_w^s = \frac{1}{1 + K_{mic} \frac{V_{mic}}{V_w} + K_{o/w} \frac{V_o}{V_w}} \quad (3)$$

Development of the previous equation resulted in the following second order equation:

$$x_w^s{}^2 \left(K_{mic/w} \frac{[A]v_{mol,A}}{\phi_w} \left(1 + K_{o/w} \frac{\phi_o}{\phi_w} \right) \right) - x_w^s \left(1 + K_{o/w} \frac{\phi_o}{\phi_w} + K_{mic/w} \left([S]v_{mol,TA} + \frac{[A]v_{mol,A}}{\phi_w} \right) \right) + 1 = 0 \quad (4)$$

with $[S]$ = total surfactant concentration (mol/m^3); $[A]$ = total antimicrobial agent concentration (mol/m^3); $v_{mol,A}$ = antimicrobial agent molar volume (cm^3/mol); ϕ_o = oil fraction; ϕ_w = water fraction; $v_{mol,TA}$ = surfactant molar volume (cm^3/mol)

The solution of this second order equation that has the lower value in the range of 0 to 1 is considered for the calculation of the fraction of free preservative in the water phase compared to the second solution that is higher than 1 and thus considered as aberrant.

3.2 Partition coefficients

3.2.1 Study of the phenylethyl alcohol micelles solubilization

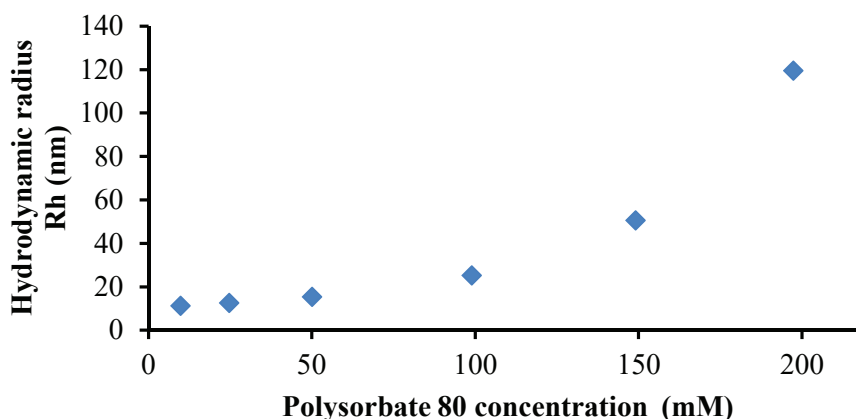


Figure 1. Effect of the polysorbate 80 concentration on the micelles hydrodynamic radius.

Measurements of the micelles hydrodynamic radius suited with an exponential behavior from 10 to 200 mM of polysorbate 80 with an increase in the R_h values from 11.4 nm to 199.6 nm (Fig. 1). Under those conditions it is clearly seen that surfactant concentration affected to a great extent the mean size of the micelles and led to an elongation increase of the spheroidal micelles. This behavior have been associated with the transformation of the spherical polysorbate 80 micelles into anisotropic large micelles upon dissolution of PEA in the micelles (Lianos et al., 1982). It has already been observed in previous studies and is characteristic of anisotropic micelles as rod-like (Mazer et al., 1976 ; Missel et al., 1980) or disk-like micelles (Tanford, 1974). The presented results do not permit a choice between these two possible shapes. Addition of PEA impacted the composition of the micelles resulting in morphological modifications explained by a highly PEA swollen spheroidal micelle near to the CMC to a rod or disk micelle transition containing a small amount of PEA at high surfactant concentrations. The hypothesis to explain the anisotropic micelles is that the amount of hydrophilic parts of the PEA were not sufficient to constitute the core of an alcohol-swollen spherical micelle (Candau et Zana, 1981). In fact, at the highest surfactant concentration of 150mM, the alcohol content would represent less that $1.5 \cdot 10^{-3}$ % of the micelles volume by considering that all the PEA has been dissolved in the micelles.

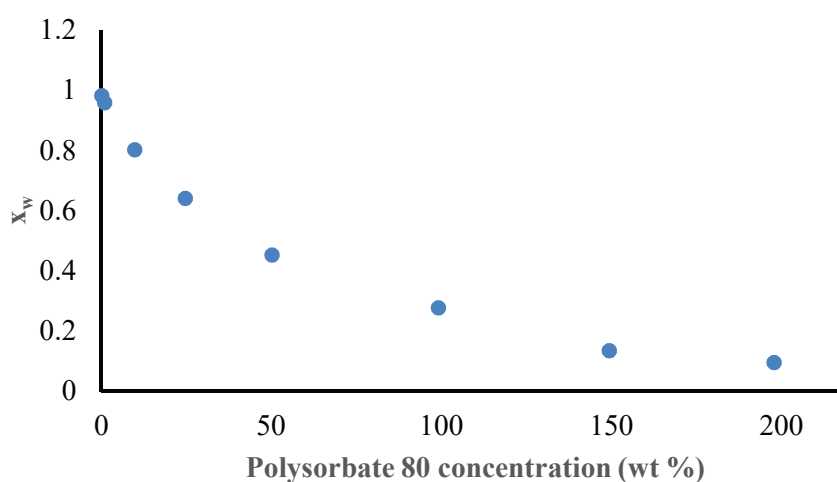


Figure 2. Evolution of the fraction of free PEA in the water as a function of the polysorbate 80 concentration.

Bahal and Kostenbauder, 1964 proved that PEA partitioned into the micellar phase without phenomenon of adsorption on the micellar surface or to sites on the macromolecules as suggested for the interaction of p-hydroxybenzoic acid esters with polysorbate 80 (Patel and Kostenbauder, 1958). NMR DOSY experiments demonstrated that the fraction of free PEA available in the aqueous phase was considerably reduced with increasing polysorbate 80 concentration (Fig. 2). Indeed, for a concentration of 3 wt% and 10 wt% of surfactant the percentage of free PEA was 1.6 and 3.6 times smaller respectively compared with the aqueous solution without polysorbate 80. This tendency is in good agreements with Kurup et al., 1992 which have proved that surfactant decreased the availability of preservatives by micellar solubilization. Moreover, Prevot et al., 2000 also found that the preservative fraction solubilized into the micelles is higher for increasing surfactant concentrations. Results are quite different from those obtained by Bahal and Kostenbauder, 1964 that found that the PEA free fraction

available in the water for a micellar solution containing 3% of polysorbate 80 was $x_w=0.75$ different of 14.7% from the $x_w=0.64$ found in this study. This difference could be explained by the temperature of 30°C used for the experiment of Bahal compared to 25°C used in this work.

The micelle/water partition coefficient for the PEA into the polysorbate 80 micelles at 3 wt% and PEA at 0.25wt% have been found to be $K_{mic/w}=17.36$. Fatemi and Karimian, 2007 found that the partition coefficient between SDS and PEA was $K_{mic/w}=2$ which is highly different proving that the molecular structure of the surfactant is a fundamental factor that has to be taken into account depending on the formulation content. In this work, preservative and surfactant interaction was important because the PEA contains an aromatic nucleus which showed a strong interaction with the polar chain of a non-ionic surfactant (Friberg et al., 1996).

3.2.2 Investigation of the oil/water preservative partition

Table 3. Measurements of the oil/water partition coefficients as a function of the PEA concentration.

PEA concentration (wt %)	$K_{o/w}$
0.075	$4.53 \pm 4.41.10^{-2}$
0.25	$4.80 \pm 8.47.10^{-2}$
1	$5.21 \pm 5.22.10^{-2}$
4	$6.83 \pm 8.20.10^{-2}$

Investigations proved that oil/water partition coefficients increased as the PEA concentrations increased from 0.075 wt% to 2 wt% (Table 3). Han and Washington, 2005 also observed that the oil/water partition coefficients of preservative was not constant and increased for benzoate concentrations from 0.05% to 2%. This may be explained by the fact that, as the PEA concentration increased the water became saturated with the antimicrobial agent resulting in higher partition in favor of the oil and thus an increasing partition coefficient. As a consequence measurements have to be done in the range of preservative concentrations generally introduced in the formulations because the partition coefficient is not a constant especially at typical used ratios.

3.3 Emulsion dosage

Table 4. Theoretical PEA content in the different phases of *Em 0.25* calculated using eq.3 compared with experimental measurements

Emulsion compartment	Theoretical PEA content (wt %)	Experimental PEA content (wt%)
Oil	0.141	0.151
Water	0.063	0.066
Micelles	0.046	0.049

The fraction of PEA in the different phases of *Em 0.25* are presented in Table 4. Results are quite different for previous studies of Han and Washington, 2005 and Watrobska-Swietlikowska and Sznitowska, 2006 that have demonstrated that a substantial fraction of

various preservatives was present at the interface (24 % and 44.5 % respectively). This may be explained by the fact that both studies were focused on phospholipid stabilized emulsion of small size (410 nm for Watrobska-Swietlikowska and Sznitowska, 2006) involving high surface contact. Indeed, Kazmi and Mitchell, 1971 demonstrated that the three phases that have to be considered are the oil, the water and the micellar phase to recover all the preservative in an emulsion and no attention have been paid to interface.

Models exposed by Bean et al., 1969 (eq.1) resulted in a calculated APE fraction present in the water of 0.13 wt% which is two times higher compared to the measured fraction of 0.059 %wt. Concerning the model exposed in the theoretical part (eq.4), it has been found that fractions of PEA calculated theoretically corresponded to the measured values with an experimental error of less than 7%. As a consequence, there is close agreement between the experimentally determined values and the model developed in this work.

3.4 Microbiological results

Several formulations from simple systems to complex ones have been tested in order to understand the impact of each excipient on the antimicrobial activity. Results are expressed in the Table 5. Solution of pure water and water containing 3 wt% of polysorbate 80 have been tested for the negative control and didn't led to any microbiological preservation as expected.

It has been measured that aqueous solution containing 0.25 wt% of APE (*Aq 0.25*) is microbiologically active and met the A criterion of the NF EN ISO 11930 norm. Addition of 3% of polysorbate 80 into the previous solution (*Mic 0.25*) resulted in a decrease of the microbiological efficiency which reached the B criterion. An emulsion containing 0.25% of PEA, 3% of polysorbate 80 and 30% of TCM (*Em 0.25*) was also tested and results showed that the formulation was not protected and that microorganism growth occurred. In all the formulations, the same quantity of PEA was added but very different results were obtained. This clearly underlines the major impact of the formulation constitution with regards to the product preservation.

Equations (2) and (4) exposed in the theoretical part have been used to determine the free PEA fraction present in the aqueous phase for the different tested formulations. This concentration represented the amount available for microbiological protection (Bean et al., 1965; Kazmi and Mitchell, 1978). For the micellar solution *Mic 0.25*, calculations with eq. 2 resulted in 0.16% of free PEA in the water. Evaluation of the microbiological efficiency of an aqueous solution without surfactant containing 0.16% of PEA correlate with the model because it was characterized by the same B criterion that has been obtained for *Mic 0.25*. The mathematical model (eq. 2) was also used to establish the PEA concentration of 0.39% that needed to be introduced into the micellar solution in order to reach 0.25% of free PEA in the water. As theoretically presumed, this micellar solution was more antimicrobial than *Mic 0.25* and met the A requirement of the microbiological assays. Concerning the emulsion *Em 0.25*, it was not protected because the fraction of free APE in the water phase was assumed to be 0.06% (eq. 4) which was insufficient to protect the formulation as proved by the microbiological assay result of *Aq 0.06*. Mathematical model presented in eq. 4 ensure that an emulsion composed of 1.0% of PEA is protected against microbial growth because it contains 0.25% of free PEA in the aqueous phase. This was correlated with microbiological assays of *Em 1.0* that actually reached the A criterion.

These results proved that in order to ensure the full formulation protection, antimicrobial content has to be respectively 1.6 and 4.3 times higher for a micellar solution and an emulsion compared to a simple aqueous solution (Fig. 3). These results are in accordance with previous works of Han and Washington, 2005 and Shimamoto et al., 1973 measuring that the concentration of methylparaben needed to preserve an emulsion system is four to five times higher and three times higher respectively that would normally be required in an aqueous solution. This is explained by antimicrobial partition into the oil phase and the micellar phase that reduce the fraction of free PEA in the water that is microbiologically active.

Table 5. Measurement of the microbiological criteria for several selected formulations.

Formulation	Microbiological criteria
<i>Aq 0.06</i>	/
<i>Aq 0.25</i>	A
<i>Aq 0.16</i>	B
<i>Mic 0.25</i>	B
<i>Mic 0.39</i>	A
<i>Em 0.25</i>	/
<i>Em 1.0</i>	A

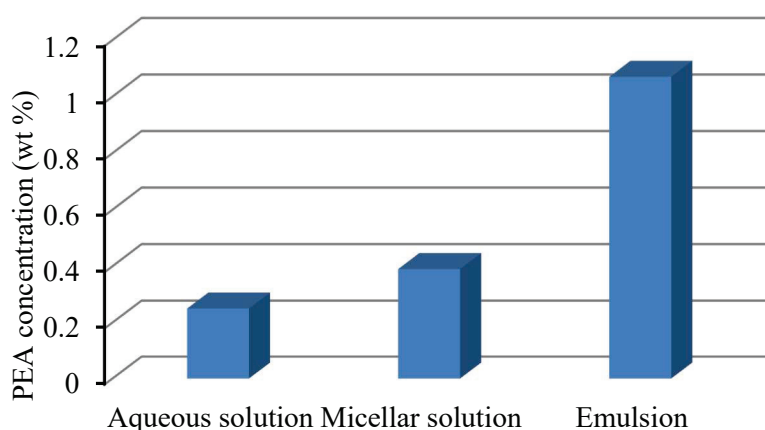


Figure 3. PEA total concentration necessary to ensure the A criterion for the microbiological protection as a function of the formulation.

Conclusion

Phenylethylalcohol added to a micellar formulation or an emulsion system partitioned between the different phases leading to a decrease in the antimicrobial concentration present in the aqueous phase that governed the antimicrobial activity. As a consequence higher preservative concentrations needed to be introduced compared to the concentrations normally employed in aqueous solutions to ensure the formulation preservation. Mathematical equation has been built to calculate the concentration of free preservative available in the water phase for microbiological protection. Emulsion dosage and microbiological measurements led to a full

correlation of the theoretical study with the experimental datas. Results provide evidence of the mathematical model validity for calculating the total phenylethyl alcohol concentration required for the microbiological protection of an emulsified system. This may be an useful tool in order to reduce the number of challenge tests realized to ensure the criterion A fulfillment resulting in the microbiological product protection during its shelf-life.

References

- C.K. Bahal, H.B. Kostenbauder, Interaction of preservatives with macromolecules V. binding of chlorobutanol, benzyl alcohol, and phenylethyl alcohol by nonionic agents. *J. Pharm. Sci.* 53 (1964) 1027–1029.
- H.S. Bean, G.H. Konning, S.A. Malcolm, A model for the influence of emulsion formulation on the activity of phenolic preservatives. *J. Pharm. Pharmacol.* 21 (1969) 173–181.
- H.S. Bean, S.M. Heman-Ackah, J. Thomas, The activity of antibacterials in two-phase systems. *J. Soc. Cosmet. Chem* 16 (1965) 15–30.
- N. Bleasel, B. Tate, M. Rademaker, Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils, *Austral J Dermatol* 43 (2002) 211–213.
- D.K. Brannan, Cosmetic preservation, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 46 (1995) 199–200.
- S. Brul, P. Coote, Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms, *Int J Food Microbiol* 50 (1999) 1–17.
- S. Candau, R. Zana, Effect of alcohols on the properties of micellar systems: III. Elastic and quasielastic light scattering study. *J. Colloid Interface Sci.* 84 (1981) 206–219.
- P.D. Darbre., A. Aljarrah, W.R. Miller, N.G. Coldham, M.J. Sauer, G.S. Pope, Concentrations of parabens in human breast tumours, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 5–13.
- M.H. Fatemi, F. Karimian, Prediction of micelle–water partition coefficient from the theoretical derived molecular descriptors. *J. Colloid Interface Sci.* 314 (2007) 665–672.
- S.E. Friberg, T. Huang, L. Fei, S.A. Vona, P.A. Aikens, Vapor pressure of phenethyl alcohol in the system with water, and polyoxyethylene, 4, lauryl ether (Brij® 30). *Interfaces, Surfactants and Colloids in Engineering*, Steinkopff. (1996) 18–22.
- E.R. Garrett, A basic model for the evaluation and prediction of preservative action. *J. Pharm. Pharmacol.* 18 (1966) 589–601.
- J. Han, C. Washington, Partition of antimicrobial additives in an intravenous emulsion and their effect on emulsion physical stability. *Int. J. Pharm.*, 288 (2005) 263–271.
- J. Hong, L. Bielory, Allergy to ophthalmic preservatives, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9 (2009) 447–453.
- S.J.A. Kazmi, A.G. Mitchell, Dialysis method for determining preservative distribution in emulsions. *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 1422–1424
- S.J.A. Kazmi, A.G. Mitchell, Preservation of solubilized and emulsified systems I: Correlation of mathematically predicted preservative availability with antimicrobial activity, *J. Pharm. Sci.* 67 (1978) 1260–1266.
- T.R.R. Kurup, L.S.C. Wan, L.W. Chan, Preservative requirements in emulsions. *Pharm. Acta Helv.* 67 (1992) 204–208
- P. Lianos, J. Lang, C. Strazielle, R. Zana, Fluorescence probe study of oil-in-water microemulsions. 1. Effect of pentanol and dodecane or toluene on some properties of sodium dodecyl sulfate micelles. *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 1019–1025.

- B.D. Lilley, J.H. Brewer, The selective antibacterial action of phenylethyl alcohol, *J Am Pharm Assoc Sci Ed* 42 (1953) 6–8.
- N.A. Mazer, G.B. Benedek, M.C. Carey, An investigation of the micellar phase of sodium dodecyl sulfate in aqueous sodium chloride solutions using quasielastic light scattering spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 1075–1085.
- M.J. Miller, Case Study of a New Growth-Based Rapid Microbiological Method (RMM) That Detects the Presence of Specific Organisms and Provides an Estimation of Viable Cell Count. *Am. Pharmaceut. Rev*, 15 (2012)
- P.J. Missel, N.A. Mazer, G.B. Benedek, C.Y. Young, M.C. Carey, Thermodynamic analysis of the growth of sodium dodecyl sulfate micelles. *J. Phys. Chem.* 84 (1980) 1044–1057.
- P. Mukerjee, Solubilization of benzoic acid derivatives by nonionic surfactants: Location of solubilizates in hydrocarbon core of micelles and polyoxyethylene mantle. *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 1528–1531.
- N.K. Patel, H.B. Kostenbauder, Interaction of preservatives with macromolecules I. Binding of parahydroxybenzoic acid esters by polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (Tween 80). *J Am Pharm Assoc* 47 (1958) 289–293.
- N.K. Patel, J.M. Romanowski, Heterogeneous systems II: influence of partitioning and molecular interactions on in vitro biologic activity of preservatives in emulsions. *J. Pharm. Sci.* 59 (1970) 372–376.
- D. Perrenoud, A. Bircher, T. Hunziker, H. Sutter, L. Bruckner-Tuderman, J. Stäger, N. Hunziker, Frequency of sensitization to 13 common preservatives in Switzerland. *Contact dermatitis* 30 (1994) 276–279.
- A.B. Prevot, E. Pramauro, M. Gallarate, M.E. Carlotti, G. Orio, Determination of micelle/water partition coefficients of cosmetic preservatives: optimisation of the capillary electrophoretic method. *Anal. Chim. Acta*, 412 (2000) 141–148.
- T. Shimamoto, H. Mima, A model for the evaluation and prediction of preservative activity in oil-in-water emulsions, *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (1979) 2743–2750.
- T. Shimamoto, Y. Ogawa, N. Ohkura, Ultrafiltration method for measuring free preservatives in aqueous phase of oil-in-water emulsions, *Chem. Pharm. Bull.* 21 (1973) 316–322.
- S. Silver, L. Wendt, Mechanism of action of phenylethyl alcohol: breakdown of the cellular permeability barrier, *J Bacteriol* 93 (1967) 560–566.
- P. Stilbs, A comparative study of micellar solubilization for combinations of surfactants and solubilizates using the fourier transform pulsed-gradient spin—echo NMR multicomponent self—diffusion technique. *J. Colloid Interface Sci.* 94 (1983) 463–469.
- C. Tanford, Ionization of cationic micelles: Effect of the detergent structure. *J Phys Chem*, 78 (1974) 2469–2479.
- L. Vermeiren, F. Devlieghere, J. Debevere, Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts, *Food Addit Contam* 19 (2002) 163–171.
- D. Watrobska-Swietlikowska, M. Sznitowska, Partitioning of parabens between phases of submicron emulsions stabilized with egg lecithin. *Int. J. Pharm.*, 312 (2006) 174–178.

Résumé des résultats principaux

Ce travail a étudié le partage de l'alcool phényléthylique au sein des différentes phases d'une émulsion que sont : les phases aqueuse, huileuse et micellaire. A partir de ces mesures il a été proposé un modèle mathématique calculant la concentration en agent antimicrobien libre au sein de la phase aqueuse d'une émulsion, qui est la quantité microbiologiquement active.

- *Détermination du partage de l'alcool phényléthylique*

La fraction d'alcool phényléthylique libre au sein de la phase aqueuse diminue lorsque la concentration en polysorbate 80 augmente. En effet, il a été déterminé que pour une concentration en tensioactif de 10 %, la concentration en agent antimicrobien libre est 3,6 fois moins importante par rapport à la solution aqueuse sans polysorbate 80. De plus, il a été mesuré que l'alcool phényléthylique est environ 5 fois moins concentré dans l'eau que dans l'huile pour une solution biphasique.

- *Mesure de la validité du modèle mathématique*

Il a été démontré par le dosage des différentes phases de l'émulsion que les fractions en agent antimicrobien mesurées correspondent à celles calculées grâce au modèle mathématique avec une différence entre les résultats inférieure à 7 %. De même, des mesures microbiologiques utilisant les cinq souches du challenge test sur une période de 14 jours ont permis de corréler les critères d'approbation relatifs à la norme NF EN ISO 11930 avec le modèle mathématique. Cette étude a notamment prouvé que la quantité en alcool phényléthylique ajoutée doit être respectivement 1,6 et 4,3 fois plus importante pour une solution micellaire et une émulsion par rapport à une solution aqueuse afin d'assurer la protection antimicrobienne.

Discussion générale, perspectives et conclusion

Discussion générale

L'objectif de ce travail de thèse était de développer un conditionnement primaire fonctionnalisé grâce à des microparticules antimicrobiennes pour la protection de formulations cosmétiques allégées en conservateurs. Afin d'y répondre, la partie expérimentale est divisée en trois parties :

- l'étude des morphologies de microparticules obtenues par microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple
- la caractérisation de films contenant des microparticules antimicrobiennes à la surface de conditionnement primaire
- le développement d'un modèle prédictif permettant de déterminer la quantité en agent antimicrobien libre en solution aqueuse au sein d'une émulsion

La première partie de ces travaux, développée au **chapitre I** de l'étude expérimentale, s'est focalisée sur l'analyse des particules obtenues suivant le procédé de microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple. En effet, en utilisant plusieurs natures de polymères afin de réaliser des microparticules utilisables pour fonctionnaliser le conditionnement primaire, il est apparu que les matrices à base de poly(ϵ -caprolactone) présentaient des états de surface tout à fait originaux. Quatre types de morphologies ont été observés : des surfaces lisses, rugueuses, trouées ou présentant des cicatrices et des défauts. Une étude bibliographique a démontré que ces dernières étaient retrouvées dans la littérature sans pour autant en étudier les causes. Cette étude a donc eu pour objectif de mettre en évidence les paramètres impactant la morphologie des microparticules de poly(ϵ -caprolactone) réalisées par microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple. Concernant la formulation, il a été démontré que la masse molaire du polymère ainsi que la masse introduite et le tensioactif utilisé pour stabiliser l'interface de l'émulsion sont des facteurs à prendre en considération pour l'obtention de surfaces lisses. De plus, la force d'agitation et de cisaillement de la pâle sont des paramètres du procédé déterminants. Concernant les mécanismes physico-chimiques responsables des dégradations, il a été supposé qu'il existe une compétition entre la vitesse d'évaporation entraînant la solidification des gouttelettes d'émulsion et les phénomènes de dégradations morphologiques mettant principalement en cause la coalescence. Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Lee et al., 1999 et Kawashima et al., 1992 et 1993 qui ont démontré que les gouttelettes d'émulsion en cours de solidification peuvent subir de la coalescence si la vitesse d'évaporation du solvant est lente. L'étude présentée a d'ailleurs prouvé que même avec l'utilisation de tensioactifs usuellement utilisés tels que l'alcool poly(vinyle) ou le polysorbate 80, l'émulsion était soumise à de la coalescence observée *in-situ* grâce à la sonde vidéo. Par conséquent, des morphologies lisses sont obtenues pour des émulsions réalisées avec des phases organiques fluides sous un cisaillement important résultant en des petites gouttelettes permettant une évaporation du solvant rapide et donc une morphologie figée dans ses premiers instants non soumise à la coalescence. Au contraire, pour

des phases organiques visqueuses et des cisaillements faibles, la taille des gouttelettes d'émulsion augmente diminuant ainsi la cinétique d'évaporation et résultant en des morphologies dégradées. Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées par Dubernet et al., 1987 qui avaient remarqué que l'état de surface des microparticules était relié à leurs tailles. Dans la présente étude, les cicatrices et défauts observés à la surface des microparticules ont été attribués à la coalescence d'un nombre restreint de particules de mêmes tailles ou de tailles différentes qui est limitée par l'évaporation du dichlorométhane [Jeffery et al., 1991]. En effet, cette évaporation solidifie les gouttelettes d'émulsion, les rendant ainsi moins sujettes à la déformation. Les morphologies rugueuses ont été attribuées aux phénomènes de coalescence limitée de nombreuses petites gouttelettes satellites d'émulsion se solidifiant rapidement à la surface de grosses gouttelettes dont l'évaporation est plus lente. Les états de surface contenant des cratères ont été observés pour des phases organiques visqueuses sous faible cisaillement. Ces trous ont été expliqués par le mouvement du cœur liquide de dichlorométhane qui perce la croûte rigide externe de la particule afin d'équilibrer les pressions osmotiques. Cette hypothèse rejoint les travaux de Li et al., 1995 qui démontrent que pour des phases organiques visqueuses les particules présentent une distribution inégale en solvant avec une périphérie moins concentrée en dichlorométhane que le cœur de la particule. Concernant l'utilisation de tensioactifs, il a été démontré que le polysorbate 80 déstabilise l'émulsion résultant en des tailles de particules obtenues plus importantes que lorsque l'alcool poly(vinyle) est utilisé [Kim et al., 2005; Benoit et al., 1999]. L'étude a démontré que ce phénomène est expliqué par la stabilisation d'une émulsion inverse par le polysorbate 80 due à un coefficient de partage en faveur du dichlorométhane, favorisant ainsi les phénomènes de coalescence résultant en des états de surface endommagés. Les cinétiques de libération des différentes morphologies obtenues ont été étudiées avec un principe actif modèle : la vitamine D₃, afin d'enrichir des travaux réalisés au sein du laboratoire utilisant ce même principe actif [Almouazen et al., 2013]. Les profils obtenus ont démontré une libération plus rapide pour des particules trouées par rapport à un état de surface lisse, en accord avec la tendance observée dans les travaux de Le Ray et al., 2003; Freiberg et Zhu, 2004 ou encore Yang et al., 2001. De plus, les particules rugueuses présentent également un relargage de la vitamine D₃ supérieur par rapport aux particules lisses. Ainsi, cette étude a démontré que des particules ayant des morphologies différentes de la plus communément retrouvée lisse peuvent être des alternatives intéressantes permettant de moduler la cinétique de libération d'un principe actif. En outre, dans le cas de contraintes spécifiques concernant notamment une augmentation du taux d'encapsulation, l'utilisation de phases organiques visqueuses est nécessaire [Rafati et al., 1997, Jeong et al., 2003, Kim et al., 2005]. Au vu des résultats obtenus le contrôle simultané du taux d'encapsulation et de la morphologie pour des particules de poly(ϵ -caprolactone) réalisées par microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple semble être un objectif difficilement atteignable.

Cette étude a permis d'enrichir la bibliographie mais les particules de poly(ϵ -caprolactone) n'ont pas été utilisées dans la suite du projet de par des taux d'encapsulation en alcool phényléthylique peu importants probablement expliqués par une mauvaise affinité avec l'agent

antimicrobien [Chung et al., 2001; Fernández-Carballido et al., 2004]. Au contraire, l'utilisation de polymétacrylate de méthyle résulte en l'obtention de particules sphériques et lisses chargées en alcool phényléthylique. Ces dernières ont donc été utilisées dans la suite de l'étude.

Suite à la réalisation de microparticules antimicrobiennes, les travaux se sont focalisés sur le développement d'un conditionnement actif antimicrobien présenté en **chapitre II** de l'étude expérimentale. Ce travail traite d'une nouvelle application, rarement étudiée pour les microparticules qui est celle de leur utilisation au sein de films antimicrobiens [Appendini et Hotchkiss, 2002; Guiga et al., 2009]. La technique très généralement utilisée d'enduction en couche mince a été sélectionnée pour fonctionnaliser le conditionnement primaire de par sa simplicité de mise en place [Scriven, 1988]. Les microparticules de polymétacrylate de méthyle chargées en alcool phényléthylique ont été enduites en couches minces à la surface de conditionnements primaires polyoléfinés afin d'obtenir *in fine* une activité antimicrobienne ciblée à des endroits sensibles à la contamination. Les travaux ont démontré, en accord avec la littérature, que la vitesse de retrait de la plaque de polyoléfine lors du procédé de revêtement par immersion, ainsi que la viscosité de la dispersion liante permettent d'augmenter l'épaisseur de la couche déposée [Brinker et al., 1991; Sonawane et al., 2004]. Les films enduits sont homogènes et lisses, sans fissures apparentes, ce qui est relativement inhabituel pour des films épais ($>455,3\mu\text{m}$) car la littérature démontre que des fissures apparaissent généralement pour des épaisseurs au-dessus de $0,5\text{-}1\mu\text{m}$ [Grosso, 2011 ; Radin et Ducheyne, 2007]. L'état de surface lisse des films peut être expliquée par une force cohésive importante du liant avec le substrat qui est supérieure à la force de tension latérale à l'intérieur du film qui se produit lors du rétrécissement résultant du séchage [Baqué et Serquis, 2007; Porter et Felton, 2010]. En outre, il a été prouvé que la variation d'épaisseur du film permet de modifier la surface de contact des microparticules d'alcool phényléthylique avec le milieu extérieur résultant en des variations des cinétiques de libération. Il a été démontré que la libération de l'alcool phényléthylique encapsulé est plus rapide pour des épaisseurs de couches moins importantes de par une surface de contact entre les microparticules et le milieu extérieur plus importante mais également une distance diffusionnelle pour l'agent antimicrobien qui diminue [Spizzirri et al., 2015; Roy et al., 1992]. De plus, la comparaison avec une couche contenant l'agent antimicrobien non encapsulé dispersé démontre la valeur ajoutée attribuée à l'utilisation de microparticules concernant une protection antimicrobienne sur des temps prolongés, avec une libération au moins 15 fois plus lente dans le cas de l'utilisation de microparticules. Ceci est expliqué par une double barrière diffusionnelle de l'alcool phényléthylique qui doit migrer au sein de deux matrices polymériques différentes afin de rejoindre le milieu externe.

L'action conservatrice localisée de la fonctionnalisation du conditionnement primaire doit permettre de diminuer la concentration en conservateur présent au sein de la formulation, répondant ainsi à la demande des consommateurs. De ce fait, la dernière partie de ces travaux, détaillée au **chapitre III** de l'étude expérimentale, a permis de développer un modèle mathématique afin de prédire la concentration requise en alcool phényléthylique permettant d'assurer la protection microbienne des formulations. Il a été démontré que les composés de la

formule impactent de manière non négligeable l'activité de l'alcool phényléthylrique de par des partages au sein des différentes phases de l'émulsion à savoir l'eau, l'huile et les micelles [Bean et al., 1965 ; Mukerjee, 1971]. En effet, la présence de polysorbate 80 a démontré réduire considérablement la concentration en agent antimicrobien libre en solution aqueuse par solubilisation au sein des micelles [Kurup et al., 1992 ; Prevot et al., 2000]. De la même façon, la présence d'huile modifie la concentration en alcool phényléthylrique libre au sein de la phase aqueuse de sorte que l'agent antimicrobien est environ 5 fois plus concentré au sein de la phase huileuse comparé à la phase aqueuse. A partir de ces études concernant une solution micellaire et une solution biphasique, un modèle mathématique a été proposé afin de mesurer la quantité d'agent antimicrobien libre en solution aqueuse d'une émulsion qui est celle permettant la protection des formulations [Kazmi et Mitchell, 1978]. Grâce à des dosages et des mesures quantitatives microbiologiques, il a été démontré la validité du modèle mathématique notamment pour le calcul de la quantité totale minimale en alcool phényléthylrique permettant d'assurer la protection microbiologique d'une émulsion, d'une solution micellaire ou encore d'une solution aqueuse, évitant ainsi de multiplier le nombre de challenge tests. Les résultats de cette étude ont prouvé que la concentration en agent antimicrobien ajouté doit être respectivement 1,6 et 4,3 fois plus importante pour une solution micellaire et une émulsion par rapport à une solution aqueuse. Ceci est en accord avec des travaux précédents qui ont mesuré que la concentration en méthylparaben nécessaire afin de conserver une émulsion est 4 à 5 fois plus importante pour Han et Washington, 2005 et trois fois plus importante pour Shimamoto et al., 1973 que la concentration normalement nécessaire dans une solution aqueuse.

Perspectives et conclusion

Les suites à donner à cette étude concernent la mesure de l'efficacité de la solution technique proposée. Il devra être testé les conditionnements primaires fonctionnalisés contenant des microparticules d'alcool phényléthylrique enduites sur des zones spécifiques au contact d'une formulation cosmétique contenant une quantité minimale d'agent antimicrobien. L'effet antimicrobien résultant de la combinaison du conditionnement primaire protecteur et d'une formulation allégée en conservateur doit être mesuré grâce à des tests de simulation *in use* développés par ACM Pharma. Dans le cas où les résultats démontreraient une efficacité inférieure à celle désirée diverses solutions sont envisageables. En effet, il pourrait être introduit au sein de la matrice deux antimicrobiens encapsulés différents ce qui pourrait permettre d'obtenir une action complémentaire par rapport à l'alcool phényléthylrique seul élargissant ainsi le spectre d'activité de la solution conservatrice proposée. Il serait également possible de remplacer l'alcool phényléthylrique par un autre agent antimicrobien toujours non listé mais davantage actif que l'alcool phényléthylrique. De plus, il aurait aussi été possible de réaliser des microparticules avec une autre technique d'encapsulation permettant d'obtenir des taux de charge plus élevés de l'ordre de 30% afin d'assurer une libération sur l'ensemble de la durée de vie du produit. Au contraire, dans le cas où les résultats des essais d'efficacité microbiologique pour des conditions *in use* s'avèreraient concluants il serait envisagé le scale-up de la solution

technique proposée. Il serait notamment à prévoir la sous-traitance de la fabrication des lots de microparticules qui est un procédé non usuel pour les entreprises participant au projet. De plus, le procédé de dip-coating utilisé dans cette étude serait éventuellement modifié par une technique de spray-coating en fonction de la surface à fonctionnaliser.

Ce travail de thèse est le résultat de plusieurs années de réflexions et d'expérimentations étudiant des sujets peu développés dans la littérature à l'interface entre plusieurs domaines scientifiques. Les résultats obtenus ont permis d'aboutir à des réponses techniques concrètes qui répondent aux demandes des industriels du projet Stabipack. En effet, il a été proposé une formulation judicieusement dosée en agent antimicrobien non listé en tant que conservateur pour laquelle le conditionnement primaire fonctionnalisé intervient dans la protection antimicrobienne. Les essais microbiologiques *in use* de la solution présentée détermineront si ce projet permettra d'offrir au consommateur un produit présentant le maximum d'atouts en termes de sécurité.

Références

- [Almouazen et al., 2013] Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L. P., Fessi, H., Briançon, S., 2013. Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation, *Pharm. Res.*, 30, 1137–1146.
- [Appendini et Hotchkiss, 2002] Appendini P., Hotchkiss J.H., 2002. Review of antimicrobial food packaging, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 3, 113–126.
- [Baqué et Serquis, 2007] Baqué L., Serquis A., 2007. Microstructural characterization of $\text{La}_{0.4}\text{Sr}_{0.6}\text{Co}_{0.8}\text{Fe}_{0.2}\text{O}_{3-\delta}$ films deposited by dip coating, *Appl. Surf. Sci.*, 254, 213–218.
- [Bean et al., 1965] Bean H.S., Heman-Ackah S.M., Thomas J., 1965. The activity of antibacterials in two-phase systems, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 16, 15–30.
- [Benoit et al., 1999] Benoit M.-A., Baras B., Gillbard J., 1999. Preparation and characterization of protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery, *Int. J. Pharm.* 184, 73–84.
- [Brinker et al., 1991] Brinker C.J., Frye G.C., Hurd A.J., Ashley C.S., 1991. Fundamentals of sol-gel dip-coating, *Thin Solid Films*, 201, 97–108.
- [Chung et al., 2001] Chung T.W., Huang Y.Y., Liu Y.Z., 2001. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLA microspheres, *Int. J. Pharm.*, 212, 161–169.
- [Dubernet et al., 1987] Dubernet C., Benoit J.P., Couarraze G., Duchêne D., 1987. Microencapsulation of nitrofurantoin in poly(ϵ -caprolactone): tableting and in vitro release studies, *Int. J. Pharm.* 35, 145–156.
- [Fernández-Carballido et al., 2004] Fernández-Carballido A., Herrero-Vanrell R., Molina-Martinez I.T., Pastoriza P., 2004. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: effect of Labrafil addition on release in vitro. *Int. J. Pharm.*, 279, 33–41.
- [Freiberg et Zhu, 2004] Freiberg S., Zhu X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release, *Int. J. Pharm.* 282, 1–18.
- [Grosso, 2011] Grosso D., 2011. How to exploit the full potential of the dip-coating process to better control film formation, *J. Mater. Chem.*, 21, 17033–17036.
- [Guiga et al., 2009] Guiga W., Galland S., Peyrol E., Degraeve P., Carnet-Pantiez A., Sebti I., 2009. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10, 203–207.

[Jeffery et al., 1991] Jeffery H., Davis S.S, O'Hagan D.T., 1991. The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation, *Int. J. Pharm.* 77, 169–175.

[Jeong et al., 2003] Jeong J.C., Lee J., Cho K., 2003. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Release* 92, 249–258.

[Kawashima et al., 1992] Kawashima Y., Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Itoh Y., 1992. Hollow microspheres for use as a floating controlled drug delivery system in the stomach, *J. Pharm. Sci.*, 81, 135–40.

[Kawashima et al., 1993] Kawashima Y., Iwamoto T., Niwa T., Takeuchi H., Hino T., 1993. Role of the solvent-diffusion-rate modifier in a new emulsion solvent diffusion method for preparation of ketoprofen microspheres, *J. Microencapsul.*, 10, 329–40.

[Kazmi et Mitchell, 1978] Kazmi S.J.A., Mitchell A.G., 1978. Preservation of solubilized and emulsified systems I: Correlation of mathematically predicted preservative availability with antimicrobial activity, *J. Pharm. Sci.*, 67, 1260–1266.

[Kim et al., 2005] Kim B.K., Hwang S.J., Park J.B., Park H.J., 2005. Characteristics of felodipine-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Microencapsul.*, 22, 193–203.

[Kurup et al., 1992] Kurup T.R.R., Wan L.S.C., Chan L.W., 1992. Preservative requirements in emulsions, *Pharm. Acta Helv.*, 67, 204–208.

[Le Ray et al., 2003] Le Ray A.M., Chiffolleau S., Iooss P., Grimandi G., Gouyette A., Daculsi G., Merle C., 2003. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly (ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility. *Biomaterials*, 24, 443–449.

[Lee et al., 1999] Lee J.H., Park T.G., Choi H.K., 1999. Development of oral drug delivery system using floating microspheres. *J. Microencapsul.*, 16, 715–729.

[Lee et al., 2000] Lee J.H., Park T.G., Choi H.K., 2000. Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method, *Int. J. Pharm.* 196, 75–83.

[Li et al., 1995] Li W.I., Anderson K.W., DeLuca P.P., 1995. Kinetic and thermodynamic modeling of the formation of polymeric microspheres using solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Release*, 37, 187–198.

[Mukerjee, 1971] Mukerjee P., 1971. Solubilization of benzoic acid derivatives by nonionic surfactants: Location of solubilizates in hydrocarbon core of micelles and polyoxyethylene mantle, *J. Pharm. Sci.*, 60, 1528–1531.

[Porter et Felton, 2010] Porter S.C., Felton L.A., 2010. Techniques to assess film coatings and evaluate film-coated products, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 36, 128–142.

[Prevot et al., 2000] Prevot A.B., Pramauro E., Gallarate M., Carlotti M.E., Orio G., 2000. Determination of micelle/water partition coefficients of cosmetic preservatives: optimisation of the capillary electrophoretic method, *Anal. Chim. Acta*, 412, 141–148.

[Radin et Ducheyne, 2007] Radin S., Ducheyne P., 2007. Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on titanium alloy fracture plate material. *Biomaterials*, 28, 1721–1729.

[Rafati et al., 1997] Rafati H., Coombes A.G.A., Adler J., Holland J., Davis S.S., 1997. Protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics, *J. Control. Release* 43, 89–102.

[Roy et al., 1992] Roy S., Pal M., Gupta B.K., 1992. Indomethacin-loaded microspheres: design and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation, *Pharm. Res.*, 9, 1132–1136.

[Scriven, 1988] Scriven L.E., 1988. Physics and applications of dip coating and spin coating, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 121, 717–729.

[Sonawane et al., 2004] Sonawane R.S., Kale B.B., Dongare M.K., 2004. Preparation and photo-catalytic activity of Fe-TiO₂ thin films prepared by sol-gel dip coating, *Mater. Chem. Phys.*, 85, 52–57.

[Spizzirri et al., 2015] Spizzirri U.G., Cirillo G., Curcio M., Spataro T., Picci N., Iemma F., 2015. Coated biodegradable casein nanospheres: a valuable tool for oral drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 29, 1–12.

[Yang et al., 2001] Yang Y.Y., Chung T.S., Ng N.P., 2001. Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials*, 22, 231–241.

Titre

Microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés.

Résumé

Il existe aujourd'hui un réel besoin de produits cosmétiques contenant une teneur réduite en conservateur ce qui représente un véritable challenge technologique. Dans ce contexte, le conditionnement primaire joue un rôle majeur et doit être force de propositions. L'objectif de cette étude est de réaliser un conditionnement actif antimicrobien par enduction d'un film mince contenant des microparticules d'agent antimicrobien. Le but de ce conditionnement primaire fonctionnalisé est d'assurer la protection de la formulation à des endroits ciblés sensibles à la contamination. Cette action spécifique permettra de réduire la concentration en agent antimicrobien au sein de la formule à la dose minimale nécessaire pour assurer la conservation du produit.

Dans un premier temps, ce travail a concerné la réalisation de microparticules chargées en agent antimicrobien suivant la technique de microencapsulation par évaporation de solvant en émulsion simple. Différentes morphologies ont été obtenues avec des microparticules éloignées du standard lisse, démontrant des cicatrices et des défauts, de la rugosité ou encore des trous. Les paramètres ainsi que les mécanismes physico-chimiques responsables des dégradations morphologiques ont été identifiés et discutés. Il a été démontré que les paramètres de formulation tels que la masse et masse molaire du polymère ou encore la présence de tensioactifs ainsi que les paramètres du procédé tels que la force et la vitesse de cisaillement modifient l'état de surface finale des microparticules. Ce travail a notamment prouvé qu'il existe une compétition entre la cinétique d'évaporation du solvant et la vitesse de coalescence des gouttelettes d'émulsion qui est à l'origine des dégradations morphologiques. Suite à cette étude, les microsphères résultantes contenant de l'alcool phényléthylique ont été enduites à la surface du conditionnement primaire polyoléfine sous forme de films minces de différentes épaisseurs grâce à la technique de revêtement par immersion. L'introduction de microparticules au sein du liant ralentit la diffusion de l'agent antimicrobien en augmentant le nombre de matrices polymériques à traverser pour atteindre le milieu extérieur. La réalisation de telles couches a permis d'obtenir des libérations sur des périodes supérieures à au moins trois mois ce qui est 15 fois plus important que celles obtenues pour l'agent antimicrobien non encapsulé. Ce travail de thèse a également étudié l'activité antimicrobienne de l'alcool phényléthylique au sein d'une émulsion. Il a été mesuré le partage de l'alcool phényléthylique entre les phases aqueuse, huileuse et micellaire de l'émulsion. Les résultats obtenus ont permis de développer un modèle mathématique calculant la fraction en agent antimicrobien libre présent en solution aqueuse. Ce dernier a été corrélé à des dosages de l'émulsion et des mesures microbiologiques utilisant les cinq souches microbiennes du challenge test sur 14 jours. Ainsi, il a été démontré que les calculs permettent de prédire la concentration en conservateur nécessaire afin d'assurer la protection antimicrobienne des formulations. Cette étude a notamment prouvé que la quantité d'alcool phényléthylique nécessaire à la conservation des formulations est respectivement 1,6 et 4,3 fois plus importante dans une solution micellaire et une émulsion par rapport à une solution aqueuse.

Mots clefs

Microencapsulation par évaporation de solvant, conservateur, film mince antimicrobien, cinétique de libération, alcool phényléthylique, conditionnement actif antimicrobien

Title

Antimicrobial agent microencapsulation for the development of functionalized primary containers.

Abstract

Nowadays there is an urgent need of cosmetic products containing low amounts of preservatives which represents a real technological challenge. In this context, the primary container plays a key role and has to be source of proposals. The objective of this study is to realize an active packaging containing coated thin films with embedded antimicrobial microparticles. The aim of this functionalized primary container is to ensure the formulation preservation at specific areas which are prone to contaminations. Thanks to the localized action of the active packaging the antimicrobial agent concentration into the bulk of the formulation will be reduced to the minimal amount necessary to ensure the product protection.

First, this work focused on the formulation of microparticles loaded with antimicrobial agent using the emulsion/solvent evaporation method. Several morphologies have been obtained with non-smooth microparticles characterized by scars and defects, roughness and holes. The parameters and the physico-chemical mechanisms involved in these morphological deteriorations have been identified and discussed. It has been shown that the formulation and processing parameters as the polymer mass and molar mass, the surfactant as well as the speed and shear rate of the propeller play a key role in the final microparticles surface states. This study proved that there is a competition between solvent evaporation and the coalescence of emulsion droplets which is responsible for the morphological degradations. Following this study, the resulting microspheres loaded with phenylethyl alcohol were dispersed in a binder and coated as thin films of various thicknesses by the dip-coating method at the polyolefin surface. It has been measured that the use of microparticles slows the antimicrobial agent diffusion by increasing the number of polymeric matrices that have to be crossed in order to reach the external medium. Such thin films resulted in an antimicrobial agent delivery up to 3 months which is 15 times higher than the delivery obtained for the non-encapsulated antimicrobial agent. The antimicrobial activity of the phenylethyl alcohol in an emulsion has also been investigated. The phenylethyl alcohol partition between the water phase, the oil phase and the micellar phase of an emulsion has been measured. These results led to the development of a mathematical model calculating the fraction of free antimicrobial agent present in the aqueous phase. It has been correlated with emulsion dosages and microbiological measurements using the five microorganisms of the challenge test during 14 days. It has been demonstrated that calculations enable the prediction of the antimicrobial agent concentration needed to ensure the antimicrobial protection. In particular, this work proved that the phenylethyl alcohol quantity necessary for antimicrobial protection is respectively 1.6 and 4.3 times higher for a micellar solution and an emulsion compared to an aqueous solution.

Key words

Microencapsulation by solvent evaporation, preservative, antimicrobial thin film, drug delivery, phenylethyl alcohol, antimicrobial active packaging